



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

I - H^+ -ATP sintetase de Cloroplastos (CF_0F_1)

Interação Enzima/Substrato

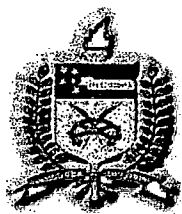
II - Efeito de Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio em Lipossomas.

Orientadora: Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa.

Marcos Paulo Morfim

Departamento de Ciências Fisiológicas – Biofísica – CCB – UFSC.

Setembro/2001



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

I - H^+ -ATP sintetase de Cloroplastos (CF_0F_1)

Interação Enzima/Substrato

II - Efeito de Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio em Lipossomas.

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Farmácia

Orientadora: Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa.

Marcos Paulo Morfim

Departamento de Ciências Fisiológicas – Biofísica – CCB – UFSC.

Setembro/2001

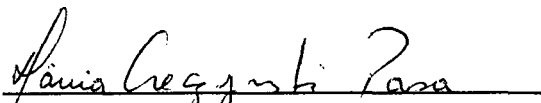
**“I - H⁺-ATPSINTETASE DE CLOROPLASTOS (CF₀F₁)
INTERAÇÃO ENZIMA/SUBSTRATO
II – EFEITO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DE
NITROGÊNIO EM LIPOSSOMAS”**


POR

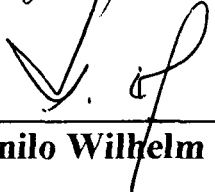
MARCOS PAULO MORFIM

**Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pela Orientadora e
membros da Banca Examinadora,
composta pelos Professores Doutores:**

Banca Examinadora:


Tânia Beatriz Creczynski Pasa (CCB/UFSC – Membro Titular)


Julio Alberto Mignaco (ICB/UFRJ – Membro Titular)


Danilo Wilhelm Filho (CCB/UFSC – Membro Titular)

**Prof^ª. Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC**

Florianópolis, 03 de Setembro de 2001.

**À minha mãe, pelo seu amor, sua dedicação
e pelo apoio incondicional em todas as fases da minha vida.**

**“Que nossos esforços desafiem as impossibilidades.
Lembraí-vos que as grandes proezas da história,
foram conquistadas do que parecia impossível”
(Charles Chaplin)**

AGRADECIMENTOS

À professora Tânia Beatriz Creczynski Pasa, pela orientação, pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos, dedicação, ensinamentos a mim concedidos e seriedade despendida durante toda a realização deste trabalho;

Ao professor Danilo Wilhelm Filho, não somente por fazer parte da banca examinadora, mas também por todo seu apoio, entusiasmo e prestatividade;

Ao professor Julio Alberto Mignaco por ter aceitado prontamente fazer parte da banca examinadora;

À professora Regina Vasconcellos Antônio, por sua disposição a fazer parte da banca examinadora;

Às professoras Rosângela Curi Pedrosa e Carla Cristina Thober Charão, por todo o incentivo e apoio em todos os aspectos, serei sempre grato a vocês.

Às professoras Evelise Maria Nazari, Josefina Steiner e Yara M. R. Müller, pela confiança e credibilidade a mim concedido;

Aos colegas do laboratório, Juliana, Heloisa, Vânia e Gustavo, pelo companheirismo e pelos inesquecíveis momentos de descontração;

À Clarissa, por nossa grande amizade, por sua prestatividade, e por toda sua ajuda na parte experimental, dentre tantas outras coisas, serei sempre grato a você;

A todos os meus amigos, especialmente à Janaína, Adriana (Adri), Ana Paula, Paulo, Vilmar, Natascha, e outros cujos nomes não estão citados aqui, mas que, com certeza não serão esquecidos, (você sabem quem são) por me mostrar o verdadeiro significado da palavra “amizade”, obrigado pelo apoio e pela presença constante em minha vida;

Aos colegas da Pós-Graduação, especialmente à Betina, Luis Flávio, Karine e Ariane, que trilharam comigo esta difícil vida acadêmica;

À minha mãe, pelo seu amor, sua dedicação, e pelo apoio incondicional em todas as fases da minha vida.

A todos os meus alunos da graduação pelo apoio e suporte;

Enfim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho.

A Deus, que me deu grande força nesta caminhada e nos deu o mais belo dos presentes: “a vida”.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XVI
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- UTILIZAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFATÁSICA DA CF_0F_1 COMO INSTRUMENTO DE ESTUDO DA INTERAÇÃO ENZIMA/SUBSTRATO.	7
1.2- UTILIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS PARA O ESTUDO DO EFEITO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DE NITROGÊNIO SOBRE MEMBRANAS BILIPÍDICAS.	8
2- OBJETIVOS.....	12
2.1-OBJETIVOS GERAIS	12
2.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3- MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1-MATERIAIS	13
3.1.1-Reagentes da Sigma®	13
3.1.2-Reagentes da Merck®	14
3.1.3-Reagentes de outras marcas	14

3.2-Equipamentos	14
3.3-ABREVIATURAS	15
3.4-ISOLAMENTO DA H^+ -ATPASE DE CLOROPLASTO DE ESPINAFRE.....	16
3.5-DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	16
3.6-RECONSTITUIÇÃO DA CF_0F_1 EM VESÍCULAS DE ASOLECITINA PELO MÉTODO DE DIÁLISE	16
3.6.1-Solubilização dos lipídeos	17
3.6.2-Reconstituição da CF_0F_1 em lipossomas	17
3.7-MEDIDA DA ATIVIDADE DE SÍNTESE DE ATP PELA CF_0F_1 RECONSTITUÍDA EM LIPOSSOMAS, COM ATIVAÇÃO PELA TRANSIÇÃO ÁCIDO-BÁSICA ATRAVÉS DA MEMBRANA ($\Delta pH/\Delta \phi$)	18
3.7.1-Síntese de ATP pelo método de um passo.....	18
3.7.2-Síntese de ATP pelo método de dois passos.....	20
3.7.3-Leitura dos resultados	21
3.8-MEDIDA DE NUCLEOTÍDEOS LIVRES E LIGADOS À ENZIMA E LIBERAÇÃO DESTES	21
3.8.1-Medida de nucleotídeos livres e ligados.....	22
3.8.2-Medida da liberação de nucleotídeos provocada pela ativação da CF_0F_1 pela transição ácido-básica através da membrana ($\Delta pH/\Delta \phi$).....	22
3.8.2.1-Liberação de ATP	23
3.8.2.2-Liberação de ADP	23
3.9-MEDIDA DO EFEITO DE DIFERENTES COMPOSTOS FOSFORILADOS SOBRE A CF_0F_1	24
3.9.1- Sobre a atividade de síntese de ATP	24
3.9.2-Sobre a atividade fosfatásica	24
3.10-PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS PARA O ESTUDO DO EFEITO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DE NITROGÊNIO.....	25
3.10.1-Lavagem dos lipossomas reconstituídos na presença de azul de metileno	26
3.10.2-Controle da incorporação de azul de metileno.....	26

3.10.3-Preparação dos lipossomas para ensaios de permeabilidade e peroxidação lipídica	26
3.11-ENSAIOS DE PERMEABILIDADE	27
3.11.1-Utilização do monóxido de nitrogênio (NO [•]) e <i>tert</i> -butilhidroperóxido.....	27
3.11.2-Utilização dos radicais hidroxil ([•] OH) e ascorbil.....	27
3.11.3-Utilização do peroxinitrito (ONOO ⁻)	28
3.12-ENSAIOS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	29
3.12.1-Avaliação da lipoperoxidação em lipossomas.....	29
3.12.2-Avaliação da lipoperoxidação em microssomas.....	30
3.13-ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
4- RESULTADOS	32
4.1-MEDIDA DA LIBERAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS PROVOCADA PELA ATIVAÇÃO DA CF ₀ F ₁	32
4.2-MEDIDA DA SÍNTESE DE ATP.....	32
4.3-COMPOSTOS FOSFORILADOS, NÃO SUBSTRATOS, TESTADOS NAS ATIVIDADES DE SÍNTESE DE ATP E HIDRÓLISE DE P-NPP PELA CF ₀ F ₁	34
4.3.1-Estudo do efeito dos compostos fosforilados, não substratos, na atividade de síntese de ATP.	36
4.3.2-Efeito do AMP, ADP, adenosina, fosfoserina e vanadato na atividade de hidrólise do p-NPP.	41
4.4-UTILIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS OBTIDOS ATRAVÉS DO MÉTODO DE RECONSTITUIÇÃO DA CF ₀ F ₁ , PARA O ESTUDO DO EFEITO DE EROS E ERNs SOBRE MEMBRANAS BILIPÍDICAS.....	46
4.5-EFEITO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DE NITROGÊNIO NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM LIPOSSOMAS.	49
5- DISCUSSÃO	54
5.1-H ⁺ -ATPSINTETASE DE CLOROPLASTOS (CF ₀ F ₁): INTERAÇÃO ENZIMA/SUBSTRATO.....	54
5.2-EFEITO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DE NITROGÊNIO EM LIPOSSOMAS.....	58

6- CONCLUSÕES	61
6.1-ESTUDO DO EFEITO DE COMPOSTOS FOSFORILADOS (NÃO-SUBSTRATOS) NA ATIVIDADE DE SÍNTESE DE ATP E NA ATIVIDADE FOSFATÁSICA DA CF_0F_1	61
6.2-USO DOS LIPOSSOMAS OBTIDOS ATRAVÉS DA RECONSTITUIÇÃO DA CF_0F_1 COMO MODELO DE ESTUDO DE EROS E ERNs.....	62
7- PERSPECTIVAS.....	63
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Curva da velocidade de síntese de ATP	34
Figura 2 -	Influência de AMP na velocidade de síntese de ATP	36
Figura 3 -	Influência de adenosina na velocidade de síntese de ATP	37
Figura 4 -	Influência de pirofosfato na velocidade de síntese de ATP	38
Figura 5 -	Influência de fosfoserina na velocidade de síntese de ATP	39
Figura 6 -	Gráfico relacionando o efeito do AMP, adenosina, fosfoserina e pirofosfato na atividade de síntese de ATP.....	40
Figura 7 -	Gráfico relacionando o efeito do AMP, ADP, Adenosina, fosfoserina e vanadato na atividade de hidrólise de p-NPP	41
Figura 8 -	Efeito de AMP na velocidade de hidrólise de p-NPP	42
Figura 9 -	Efeito de ADP na velocidade de hidrólise de p-NPP.....	43
Figura 10-	Efeito de Fosfoserina na velocidade de hidrólise de p-NPP	44
Figura 11-	Efeito de vanadato na velocidade de hidrólise de p-NPP	45
Figura 12-	Efeito de Adenosina na velocidade de hidrólise de p-NPP	45
Figura 13-	Efeito de Triton X-100 em lipossomas incorporados com azul de metileno	47
Figura 14-	Efeito de Triton X-100 em lipossomas incorporados com azul de metileno	47
Figura 15-	Efeito de NO, <i>tert</i> -butilhidroperóxido, radical hidroxil e ascorbil na permeabilidade dos lipossomas.	48
Figura 16-	Efeito de peroxinitrito (ONOO ⁻) na permeabilidade dos lipossomas.	49
Figura 17-	Peroxidação lipídica em lipossomas e microsomas de fígado de rato induzida por radical ascorbil.	51

Figura 18- Peroxidação lipídica em lipossomas e microsomas de fígado de rato induzida por radical hidroxil.....	51
Figura 19- Efeito do nitroprussiato de sódio (NaNPS) na peroxidação lipídica em lipossomas	52
Figura 20- Efeito do peroxinitrito (ONOO ⁻) na peroxidação lipídica em lipossomas	52
Figura 21- Peroxidação lipídica em lipossomas, provocados por radicais hidroxil ([•] OH), ascorbil, peroxinitrito (ONOO ⁻) e monóxido de nitrogênio.	53
Figura 22- “The binding change mechanism” proposto por Boyer	55
Figura 23- Ciclo catalítico da CF ₀ F ₁	56
Figura 24- Ligação dos compostos fosforilados na enzima	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Compostos testados nas atividades de síntese de ATP e fosfatásica da CF_0F_1 e suas respectivas fórmulas estruturais.....	35
Tabela 2- Constantes de inibição relacionadas ao efeito de diferentes compostos sobre a atividade de síntese de ATP pela CF_0F_1	40
Tabela 3- Constantes de inibição relacionadas ao efeito de diferentes compostos sobre a atividade fosfatásica da CF_0F_1	46

RESUMO

I - H^+ -ATP sintetase de Cloroplastos (CF_0F_1)

Interação Enzima/Substrato

II - Efeito de Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio em Lipossomas.

Neste trabalho foram estudados os efeitos de alguns compostos fosforilados e não fosforilados sobre as atividades catalíticas de H^+ -ATP sintetase de cloroplastos, CF_0F_1 . As atividades testadas foram a de síntese de ATP e a fosfatásica. Foi também implementada uma técnica utilizando lipossomas, obtidos através do processo de reconstituição da enzima, como modelo para o estudo dos efeitos de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio em membranas bilipídicas.

Foi testado o efeito de AMP, fosfoserina, pirofosfato e da adenosina na atividade de síntese de ATP pela CF_0F_1 , ativada pela implementação de um potencial eletroquímico através da membrana, e de AMP, ADP, fosfoserina, vanadato e adenosina na atividade de hidrólise do p-NPP, pela CF_0F_1 solúvel, medida espectrofotometricamente através da absorção do p-NP (p-nitrofenol), liberado pela hidrólise do substrato p-NPP (p-nitrofenilfosfato).

Observou-se que o AMP, a fosfoserina e o pirofosfato inibem a síntese de ATP, apresentando constantes de inibição ($K_{0,5}$) muito semelhantes, enquanto a adenosina não alterou a atividade da enzima.

Na atividade fosfatásica, todos os compostos mostraram uma inibição competitiva, observada através do gráfico plot de Dixon com K_i s de 0.3 mM (fosfoserina), 1.8 mM (AMP), 1.7 mM (ADP) e vanadato com $K_{0,5}$ igual a 0,1 mM. A adenosina não alterou esta atividade.

Os resultados obtidos evidenciaram que todos os compostos testados inibem esta atividade, através do grupamento fosfato. Entretanto, as constantes de inibição não foram semelhantes, ao contrário do observado nas inibições da atividade de síntese de ATP, sendo provável que os sítios da enzima envolvidos nestas duas atividades sejam diferentes.

Além disso, a inibição da atividade fosfatásica da CF_0F_1 pelo vanadato, com o $K_{0,5}$ menor quando comparado com os outros compostos, reforça esta interpretação, pois o

vanadato pode ser considerado como um análogo do fosfato. Soma-se a isto o fato de que a adenosina, parte orgânica dos nucleotídeos de adenina, não tenha causado inibição em ambas atividades testadas.

Tais resultados nos permitem sugerir que o grupamento fosfato é responsável pela especificidade da ligação de moléculas fosforiladas na enzima.

Um segundo estudo apresentado nesta dissertação envolve a implementação de um modelo com lipossomas, de bicamada lipídica, para possíveis estudos de permeabilidade de membranas e peroxidação lipídica.

Os lipossomas foram formados pelo método de diálise, o mesmo utilizado para a reconstituição da CF₀F₁. Para estudos de permeabilidade, particularmente, o azul de metileno foi incorporado nos lipossomas. Um influxo do corante, observado nos lipossomas sem tratamento com detergente, evidenciou que o corante fica retido no interior dos lipossomas.

Os testes de permeabilidade ao azul de metileno sob a ação de diferentes espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, como monóxido de nitrogênio (NO[•]), peroxinitrito (ONOO⁻), radical hidroxil ([•]OH) e ascorbil, não mostraram mudanças na permeabilidade dos lipossomas. Todavia, excetuando o monóxido de nitrogênio, todos provocaram peroxidação lipídica. Esses resultados sugerem que em nosso modelo a peroxidação lipídica não está diretamente relacionada com a mudança de permeabilidade, pelo menos a macromoléculas como o azul de metileno. Entretanto, mostrou ser um modelo viável para o estudo de lipoperoxidação. Em futuros estudos utilizaremos esta metodologia para testar os efeitos de EROs e ERNs na permeabilidade da membrana a íons como H⁺ e Ca²⁺, bem como a ação de substâncias antioxidantes.

ABSTRACT

I - H^+ -ATP synthase from Chloroplasts (CF_0F_1)

Enzyme/Substrate Interaction

II - Effect of Reactive Oxygen and Nitrogen Species on Liposomes.

The effects of some phosphorylated and non-phosphorylated compounds on catalytic activities (ATP synthesis and phosphatase) of the H^+ -ATP synthase from chloroplasts (CF_0F_1) were studied.

A technique was also implemented using liposomes obtained by the same method used to reconstitute the CF_0F_1 , as a model to study the effects of oxygen and nitrogen reactive species on bilayer membranes.

The effects of AMP, phosphoserine, pyrophosphate and adenosine on ATP synthesis activity were analyzed. The enzyme was activated by an electrochemical potential through the membrane. AMP, phosphoserine and pyrophosphate inhibited on ATP synthesis with very similar $K_{0,5}$, while adenosine did not alter the enzyme's activity.

AMP, ADP, phosphoserine, vanadate and adenosine inhibited p-NPP (p-nitrophenylphosphate) hydrolysis by soluble CF_0F_1 . The measurements were carried out spectrophotometrically through the light absorption by p-NP (p-nitrophenol), produced by the hydrolysis of p-NPP. All compounds tested competitively inhibited the phosphatase activity, as evidenced through a Dixon plot, and the inhibition constants K_i obtained were equal to 0.3 mM (phosphoserine), 1.8 mM (AMP), 1.7 mM (ADP) and vanadate with $K_{0,5}$ 0,1 mM.

The inhibition of phosphatase activity by vanadate, which presented a lower $K_{0.5}$ (0,1 mM) when compared to the other compounds, is an important observation since this ion may be regarded as an analog of the phosphate group. In addition, the organic adenosine region of the adenine nucleotides, lacking only the phosphate group of the molecule, did not alter the enzyme activities.

These observations, together with the kinetic analysis described here, allow us to suggest that the phosphate group is the major responsible for the specificity of the enzyme for phosphorylated molecules.

A second study shown in this work was related to a new liposome bilayer model designed to investigate the action of ROS and RNS on membrane permeability and lipid peroxidation.

The liposomes were formed by the same dialysis method as that used for the reconstitution of CF_0F_1 . For the permeability studies methylene blue was incorporated into the liposomes during the dialysis process. The dye efflux shown in the presence of Triton X-100 is a strong evidence that methylene blue remains inside the vesicles.

In assays of permeability to methylene blue under the action of different ROS and RNS, including nitrogen monoxide, peroxynitrite, hydroxyl and ascorbil radicals, there were no changes in membrane permeability, however, all of these substances provoked lipid peroxidation, according to results obtained by the TBARS method.

These results suggest that lipid peroxidation is not directly related to changes in membrane permeability in this model, at least with regard to macromolecules as methylene blue. In the meantime this model was found to be suitable in lipoperoxidation studies. In the near future this model will be used to investigate the effects of ROS and RNS on membrane permeability to ions such as H^+ and Ca^{2+} as well as the action of antioxidant compounds.

1- INTRODUÇÃO

O ATP é a principal forma de energia encontrada nas células vivas e é sintetizado pelas ATPsintetases, também chamadas de F_0F_1 ATPsintetases ou F_0F_1 ATPases (DIMROTH, MATTHEY & KAIM, 2000). Este substrato é usado pelas células para movimentação, transporte ativo, síntese metabólica e outros processos que requerem energia.

As ATPsintetases estão presentes em mitocôndrias, cloroplastos e bactérias fotossintetizantes e são as enzimas-chave no metabolismo energético, envolvidas na fosforilação oxidativa e na fosforilação fotossintética (van WALRAVEN & BAKELS, 1996).

Acopladas às membranas, as H^+ -ATPases catalisam a síntese e hidrólise de ATP em bactérias, cloroplastos e mitocôndrias, usando a diferença de entalpia livre (energia livre) derivada do transporte de prótons através da membrana para sintetizar ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (POSSMAYER *et al.*, 2000). O transporte de prótons ocorre devido à diferença de pH entre o lado interno e externo da membrana (ΔpH), além de uma diferença de potencial elétrico ($\Delta\phi$), que resultam em um fluxo de prótons através das membranas.

O gradiente de prótons é gerado através da cadeia de transportadores de elétrons na respiração (fosforilação oxidativa), ou pela cadeia de transporte de elétrons gerados pela luz na fotossíntese. As ATPsintetases convertem a energia gerada pelo gradiente de prótons através da membrana convertendo-a na forma química do ATP (DUNN, BI & REVINGTON, 2000).

O mecanismo de acoplamento entre o transporte de prótons e a síntese de ATP ainda é desconhecido. Atualmente duas hipóteses são discutidas:

1- segundo MITCHELL (1974), os prótons fluem a partir de alto potencial e tem acesso direto ao centro catalítico, mudando o equilíbrio entre os substratos ligados e o ATP.

2- segundo BOYER (1975 e 1997), a ligação de ADP e Pi leva à formação de ATP fortemente ligado. A ligação de prótons do lado de alto potencial provoca mudanças conformacionais, causando a liberação de ATP da enzima.

Segundo a teoria do “binding change mechanism”, proposta por BOYER (1975, 1997), a energia liberada pela dissipação do gradiente de prótons seria utilizada somente para a liberação do produto, no caso o ATP. ELSTON *et al.* (1998) descreveram um modelo interessante para explicar a transdução de energia na síntese de ATP, baseado em estudos estruturais e funcionais da H^+ -ATPase.

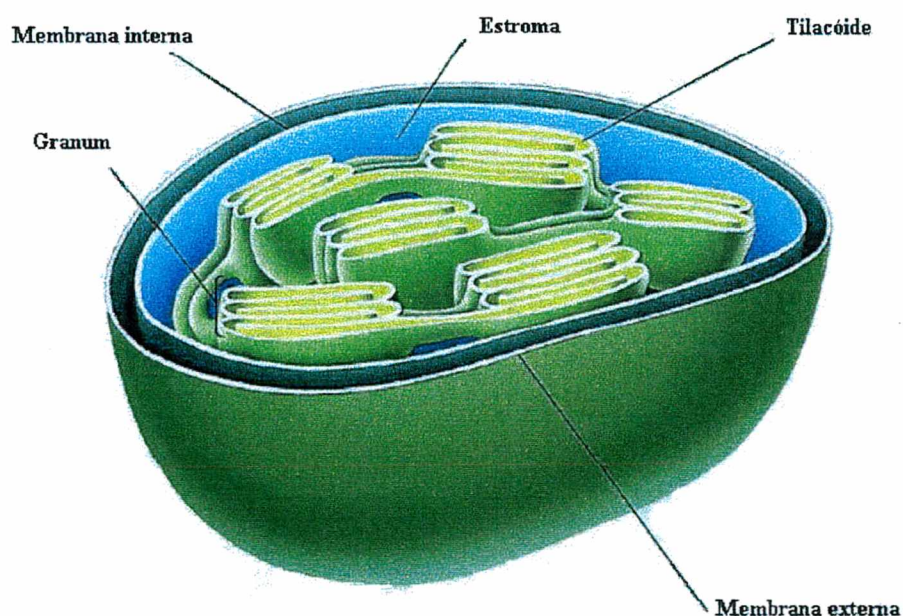
As ATPases estão classificadas em três classes, segundo PEDERSEN & CARAFOLI (1987 a,b):

1) As ATPases do tipo P, que no ciclo de reações forma um complexo covalente com o fosfato. A este grupo pertencem as Na^+/K^+ -ATPases, as Ca^{++} -ATPases, inclusive as de membrana plasmática e as K^+ -ATPases de bactérias.

2) As ATPases do tipo V, encontradas em leveduras, vacúolos e no complexo de Golgi; hidrolisam ATP acopladamente a um transporte de prótons.

3) As ATPases do tipo F. A este grupo pertence a H^+ -ATPase de cloroplastos (CF_0F_1), de mitocôndrias, (MF_0F_1), de *Escherichia coli* (EF_0F_1), e de bactérias termofílicas (TF_0F_1).

A H^+ -ATPase de cloroplastos localiza-se na membrana tilacóide que, por sua vez, encontra-se no interior do cloroplasto. O cloroplasto é composto de uma membrana externa e uma membrana interna, e estruturas de membranas chamadas tilacóides, que se apresentam como pequenas cavidades achatadas em forma de bolsas. Uma pilha destas bolsas chama-se granum. Os granum são conectados por extensões da própria membrana tilacóide chamadas de lamelas. Devido à disposição das três membranas presentes no cloroplasto, ele apresenta três espaços separados. O espaço intermembrana, o estroma, onde se encontram algumas proteínas solúveis e o lúmen (espaço dentro do tilacóide) COOPER (2000). A estrutura de um cloroplasto pode ser visualizada na figura abaixo¹:



Um processo importante de interconversão de energia acontece nas membranas tilacóides, que é a fotossíntese. A fotossíntese é a transformação da energia luminosa em energia química. A iluminação leva à geração de um gradiente de prótons através da membrana, resultando na formação do ATP, e de uma substância com alto poder redutor, o

¹ Modificado de COOPER (2000).

NADPH. As reações que se processam no escuro, fazem parte do processo secundário em que o ATP e NADPH formados na presença de luz são utilizados para a produção de hexoses e outros compostos, necessários no metabolismo dos vegetais COOPER (2000).

Todas as ATPases do tipo F podem ser fisicamente divididas em uma porção que se encontra integrada à membrana (porção F_0) envolvida no transporte de prótons através da membrana, e uma porção periférica (porção F_1) que catalisa a síntese e a hidrólise de ATP (DUNN, BI & REVINGTON, 2000)

Nos cloroplastos e bactérias fotossintetizantes as H^+ -ATPases estão localizadas nos tilacóides e cromatóforos, respectivamente, com a porção F_1 orientada para o estroma e citoplasma. Na mitocôndria a enzima está localizada na membrana interna, com a porção F_1 orientada para a matriz mitocondrial (van WALRAVEN & BAKELS, 1996).

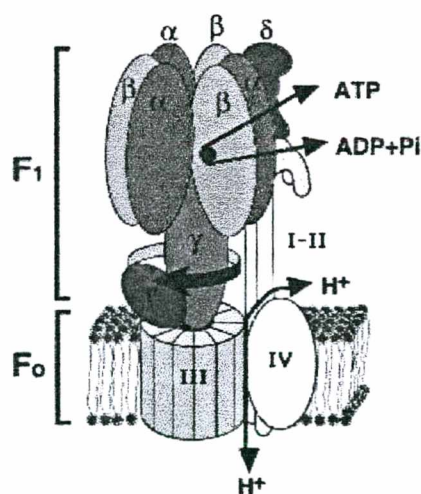
Com relação à H^+ -ATP sintetase de cloroplastos (CF_0F_1), a porção CF_0 com características hidrofóbicas encontra-se integrada à membrana, e a porção CF_1 com características hidrofílicas localiza-se periféricamente à membrana. Na CF_1 estão localizados os sítios de ligação para nucleotídeos, onde ocorrem, conseqüentemente, as reações catalíticas.

A CF_0 apresenta quatro diferentes subunidades, denominadas arbitrariamente de I (19 KDa), II (16.5 KDa), III (8 KDa) e IV (24.6 KDa); com estequiometria, I_1 , II_{1-2} , III_{6-12} e IV_1 (MCCARTY & RACKER, 1968). Este modelo supõe que as subunidades III formam um canal transmembrana, as subunidades I e II fazem a ligação entre CF_0 e CF_1 e a subunidade IV (FROMME *et al.*, 1987; GRÄBER *et al.*, 1990). Entretanto, foi demonstrado por experimentos com microscopia eletrônica, que parte da F_0 está conectada à porção F_1 por pelo menos duas subunidades. Entretanto neste estudo ainda não foi possível a identificação das mesmas (BÖTTCHER *et al.*, 1998).

A CF_1 também apresenta várias subunidades diferentes denominadas como α (55.4 KDa), β (53.9 KDa), γ (35.7 KDa), δ (20.0 KDa) e ϵ (14.7 KDa) (GRÄBER *et al.*, 1990) com a estequiometria α_3 , β_3 , γ_1 , δ_1 e ϵ_1 . As subunidades α e β participam diretamente da catálise. A subunidade γ tem uma função reguladora com relação aos estados redox da enzima (NALIN & MCCARTY, 1984), e parece ser o eixo de rotação da CF_1 durante a síntese de ATP, segundo observações realizadas através de experimentos com a proteína imobilizada (SABBERT *et al.*, 1996). Segundo ENGELBRECHT & JUNGE (1988), a subunidade δ regula o fluxo de prótons. Finalmente, tem-se a subunidade ϵ , que também apresenta função regulatória, possivelmente inibitória (NELSON *et al.*, 1972).

Existem poucas diferenças entre os complexos F_0F_1 de bactéria, cloroplastos e mitocôndrias, sendo suas subunidades bem conservadas e seus mecanismos de reação altamente similares (DUNN, BI & REVINGTON, 2000).

Uma organização esquemática das subunidades da CF_0F_1 , bem como o mecanismo de translocação de prótons e a catálise, podem ser elucidadas no esquema abaixo².



² Modificado de WADA, SAMBONGI & FUTAI, 2000.

As H^+ -ATPases de cloroplastos, mitocôndrias e bactérias, depois de isoladas ou expostas a ATP ou ADP, retêm um ADP ligado após a remoção dos nucleotídeos livres por filtração em gel. O ADP presente na enzima tem sido denominado ADP fortemente ligado (MAGNUSSON & MCCARTY, 1976; BRUIST & HAMMES 1982). LUNARDI *et al.* (1987) e WISE *et al.* (1987), em trabalhos com nucleotídeos modificados como o 2-azidoadenina, têm mostrado que existem dois tipos de sítios de ligação para nucleotídeos, catalíticos e não catalíticos, e que o ADP fortemente ligado pode estar presente nos dois tipos de sítios (CRECZYNSKI-PASA *et al.*, 2000)

Outros autores mostraram que ao provocar-se a energização da membrana induz-se a liberação do ADP fortemente ligado a CF_0F_1 . GRÄBER *et al.* (1977) mostraram que, nestas condições, a CF_0F_1 é ativada, tanto para a hidrólise quanto para a síntese de ATP. A religação de ADP à enzima, depois da dissipação do gradiente eletroquímico, leva à inativação da atividade ATPásica (CARMELI & LIFSHITZ, 1972; DUNHAM & SELMAN, 1981).

A H^+ -ATPase de cloroplastos apresenta dois estados, o estado inativo (E_i) e o estado ativo (E_a). Através da aplicação de uma diferença de potencial eletroquímico ($\Delta\mu H^+$) entre os dois lados da membrana, a enzima passa do estado inativo para o estado ativado. Depois de dissipado o $\Delta\mu H^+$, a enzima volta ao estado inativo. A enzima, quando ativada, pode tanto sintetizar quanto hidrolisar ATP. van WALRAVEN & BAKELS (1996) sugerem que a enzima, quando ativada, sintetiza ou hidrolisa uma molécula de ATP para cada 4 prótons (H^+) transportados. A atividade da CF_0F_1 pode ser verificada pela síntese e pela hidrólise de ATP, com ativação através de um potencial eletroquímico entre os lados interno e externo da membrana, quando a CF_0F_1 estiver reconstituída em lipossomas. A importância do processo de reconstituição da CF_0F_1 em proteolipossomas torna-se evidente nas investigações mecanísticas, onde a enzima isolada e reconstituída representa uma situação muito mais simples e de constituição conhecida. Além disso, contrariamente às preparações de CF_0F_1

solúvel, a enzima reconstituída em lipossomas pode ser ativada pelo $\Delta pH/\Delta\phi$, sendo esta a maneira natural de sua ativação, segundo as teorias de MITCHELL (1974) e BOYER (1989 e 1997). A hidrólise de ATP pela enzima solúvel também pode ser ativada pela adição de sulfito de sódio (LARSON *et al.*, 1989; CRECZYNSKI-PASA & GRÄBER, 1994).

O fato das H^+ -ATPases serem muito complexas, apresentando diversos sítios para nucleotídeos, os quais interagem entre si, dificulta o estudo do mecanismo de síntese de ATP, processo que ainda não está totalmente esclarecido e merece ser investigado. O funcionamento desta enzima é estudado normalmente em preparações de membranas de tilacóide ou CF_1 isolada. Uma outra abordagem seria a purificação da enzima e a reconstituição desta em uma membrana lipídica.

A importância do processo de reconstituição da CF_0F_1 em proteolipossomas torna-se evidente nas investigações mecanísticas sobre a enzima. O isolamento da enzima transporta a mesma de um sistema extremamente complexo, que é a membrana tilacóide, para um sistema muito mais simples e de constituição conhecida. Além disso, a CF_0F_1 solúvel não apresenta atividade de síntese de ATP e uma atividade de hidrólise de ATP extremamente baixa (1-5 mol ATP/mol CF_0F_1 /s).

1.1- UTILIZAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFATÁSICA DA CF_0F_1 COMO INSTRUMENTO DE ESTUDO DA INTERAÇÃO ENZIMA/SUBSTRATO.

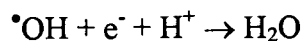
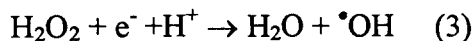
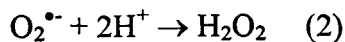
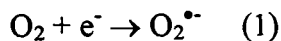
Foi caracterizada, pela primeira vez uma atividade fosfatásica da CF_0F_1 , promovendo a hidrólise de p-NPP (CRECZYNSKI-PASA *et al.*, 1997). Através deste estudo foi demonstrada a capacidade da enzima de hidrolisar pseudo-substratos, observando-se também que o ATP compete por um sítio com o p-NPP, e em ensaios em que se dosava a atividade da enzima pela hidrólise de ATP, foi constatado que o p-NPP compete com o ATP pelo mesmo

sítio. O Pi (fosfato inorgânico) por sua vez, também inibiu a ligação do p-NPP em ensaios de síntese de ATP com a enzima reconstituída em lipossomas.

Entretanto, a hidrólise de p-NPP foi realizada com a enzima no estado latente, ou seja, no estado não ativado, uma vez que em situações nas quais a enzima era ativada, a hidrólise do p-NPP era totalmente inibida. A utilização de pseudo-substratos, é muito empregada em ATPases transportadoras do tipo P, como ferramentas para estudo dos ciclos catalíticos das enzimas. Como exemplo, cita-se o trabalho de MIGNACO *et al.* (1996), com a Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático.

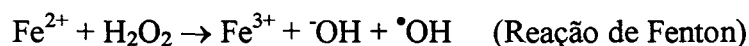
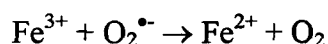
1.2- UTILIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS PARA O ESTUDO DO EFEITO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DE NITROGÊNIO SOBRE MEMBRANAS BILIPÍDICAS.

O oxigênio é indispensável para a grande maioria dos seres vivos na Terra. O caminho primário pelas mitocôndrias da célula na produção de energia química, na forma de ATP, , é ligada à redução de O_2 em H_2O , com raras exceções. Embora 90% do oxigênio seja utilizado pelo corpo humano pela citocromo oxidase, a qual adiciona 4 elétrons em cada molécula de O_2 para formar H_2O , o O_2 é também usado como substrato por um grande número de outras enzimas. JONES (1986) enumerou 30 enzimas, além da citocromo oxidase, que usam oxigênio em rins de mamíferos, cada uma com diferente afinidade pelo oxigênio, e envolvidas em diferentes processos metabólicos. Destes processos podemos citar o metabolismo de aminas biológicas, prostaglandinas, purinas, esteróides, aminoácidos e carnitina. Muitas dessas reações geram espécies reativas de oxigênio (EROs) como radical superóxido (1), peróxido de hidrogênio (2) e radical hidroxil (3), formados nas reações mostradas como segue:



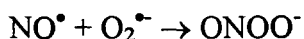
Estas EROs podem derivar também de outras atividades celulares, incluindo autoxidação de pequenas moléculas (flavinas, catecolaminas, hidroquinonas), ação das redutases de flavoproteínas e dos citocromos P₄₅₀, etc. O radical ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio não são tão reativos, mas a reação deles com os componentes do meio celular leva à formação de radical hidroxil (como mostrado acima), o qual está envolvido em uma série de danos em macromoléculas celulares (KLEINVELD *et al.*, 1989). Em alguns casos a ação destrutiva das EROs é benéfica ao organismo, no caso de células fagocíticas na destruição de microorganismos invasores. Entretanto, estas moléculas devem ser eliminadas rapidamente para evitar danos indesejáveis às células.

A maior parte da produção de radical hidroxil, *in vivo*, é gerada na reação de H₂O₂ com superóxido (reação de Haber-Weiss), a qual, na realidade, apresenta dois passos, e é dependente de Fe³⁺ e algumas vezes de Cu³⁺, envolvendo a reação de Fenton, como segue:



O monóxido de nitrogênio (NO[•]), mais conhecido como óxido nítrico, que faz parte das espécies reativas de nitrogênio (ERNs), é um outro exemplo de radical livre produzido biologicamente, tendo um amplo espectro de ação no organismo humano, muito conhecido

principalmente pelo seu potencial de promover vasodilatação. A reação do óxido nítrico com o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pode levar à formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), na reação que se segue abaixo:



O peroxinitrito, apesar de não ser um radical livre, é um poderoso oxidante e causa danos em moléculas biológicas (BECKMAN *et al.*, 1990; SARAN *et al.*, 1990).

Todos os componentes celulares são susceptíveis às EROs e às ERNs, particularmente aos radicais hidroxilas e ao peroxinitrito. Eles atacam proteínas, levando à modificação de aminoácidos; provocam oxidação de grupos sulfidrilas, causando mudanças conformacionais, que alteram atividades enzimáticas, quebra de ligações peptídicas, bem como modificações em glicoproteínas, perda de metal em metaloproteínas, e aumento na susceptibilidade à proteólise (SIES, 1993).

Ácidos graxos poliinsaturados, como o ácido araquidônico, e outros lipídeos e proteínas, que fazem parte das membranas biológicas, também são modificados quimicamente por radicais livres, alterando as propriedades dinâmicas como a fluidez e a permeabilidade das membranas biológicas. Modificações na permeabilidade de membrana ao Ca^{2+} , por exemplo, podem causar a ativação descontrolada de fosfodiesterases, e eventual ruptura da membrana (HALLIWELL, 1999; CASTELLI *et al.*, 1997). Os danos oxidativos como a peroxidação lipídica, mediados por estas espécies reativas em membranas biológicas podem também provocar alterações no DNA, provocando mutações nas bases nitrogenadas (YIN *et al.*, 1998).

A composição lipídica e o estado físico das membranas são muito importantes, pois estão relacionados com a conformação e atividade de muitas enzimas e receptores ligados às membranas, muitos dos quais ligados à sinalização celular (YIN *et al.*, 1998).

Atualmente muitos modelos biológicos têm sido desenvolvidos para verificar o efeito de EROs e ERNs. Lipossomas são geralmente aceitos como modelo para o estudo dos efeitos de radicais livres sobre membranas, principalmente quando são formados por uma bicamada lipídica, estruturalmente similar à matriz lipídica das células (CASTELLI *et al.*, 1997).

Neste trabalho utilizamos lipossomas obtidos através do processo de reconstituição da CF₀F₁, processo relativamente simples, conforme descrito por SONE *et al.* (1977), com algumas modificações. Os lipossomas, no final do processo de reconstituição, foram submetidos à ação de diferentes espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, como radical hidroxila, monóxido de nitrogênio e peroxinitrito. A investigação dos efeitos destas moléculas foi realizada através da análise da integridade da membrana, através da monitoração da permeabilidade ao azul de metileno e a peroxidação lipídica.

2- OBJETIVOS

2.1-OBJETIVOS GERAIS

- 1- Evidenciar cineticamente a participação do grupamento fosfato, no direcionamento do substrato no sítio catalítico da CF_0F_1 .
- 2- Utilizar os lipossomas obtidos através do processo de reconstituição da CF_0F_1 como modelo de estudo da ação de EROs e ERNs em biomoléculas.

2.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Através dos métodos de reconstituição da enzima em lipossomas e da medida de síntese de ATP, pretendemos:

1. Avaliar a influência de compostos fosforilados, não-substratos, na atividade de síntese de ATP.
2. Verificar o efeito de compostos fosforilados, não-substratos, na atividade fosfatásica da CF_0F_1 .
3. Implementar um modelo para a investigação dos efeitos de EROs e ERNs na integridade de membranas bilipídicas.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1-MATERIAIS

3.1.1-Reagentes da Sigma®

Ácido ascórbico

Ácido tiobarbitúrico (TBA)

Adenosina

ADP

Albumina bovina sérica (BSA)

AMP

ATP

Fosfoenolpiruvato (PEP)

Fosfoserina

Luci-kit (Luciferina-luciferase)

para-Nitrofenilfosfato (p-NPP)

Pirofosfato (PPi)

Piruvato kinase (PK)

Reagente de Folin

tert-butilhidroperóxido (t-BuOOH)

Triton X-100

Valinomicina

Vanadato

3.1.2-Reagentes da Merck®

Ácido clorídrico (HCl)
Ácido etileno-dinitrilo-tetraacético (EDTA)
Azul de metileno
Cloreto de ferro (FeCl₃)
Cloreto de magnésio (MgCl₂)
Cloreto de potássio (KCl)
Fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄)
Fosfato monobásico de sódio (NaH₂PO₄)
Hidróxido de potássio (KOH)
Hidróxido de sódio (NaOH)
Nitrito de sódio (NaNO₂)
Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)
Sulfato de cobre (CuSO₄)
Sulfato de ferro (FeSO₄)
Tartarato de sódio
Tricina
Tris

3.1.3-Reagentes de outras marcas

Ácido tricloroacético (TCA) - Synth®
Asolecitina - Fluka®
Colato de sódio - Serva®
Desoxicolato de sódio – Boeringer Mannheim®
Ditiotreitol (DTT) - Serva®

3.2-Equipamentos

Agitador magnético – Fisatom®
Balança analítica - Sartorius®
Banho-Maria – Quimis®
Botijão criogênico - Cryometal®

Espectrofotômetro - Pharmacia®
 Freezer - Prosdócimo®
 Freezer -70°C - Harris®
 Luminômetro – Bio Orbit®
 Microcentrífuga - Eppendorff®
 pH metro – Schott®
 Processador ultrassônico - Branson®
 Refrigerador - Clímax®
 Registrador – Kipp & Zonen®
 Vortex – Biomatic®

3.3-ABREVIATURAS

$\Delta\phi$ = diferença de potencial elétrico;
 $\Delta\mu H$ = diferença de potencial eletroquímico;
 ΔpH = diferença de pH;
AMP, ADP, ATP = adenosina mono, di e trifosfato, respectivamente;
CF₀F₁ = H⁺-ATPase ou próton ATPase ou ATPsintetase de cloroplastos;
DTT = ditionitrito;
EDTA = ácido etileno dinitrilo tetraacético;
ERNs = espécies reativas de nitrogênio;
EROs = espécies reativas de oxigênio;
NaNPS = Nitroprussiato de sódio
PEP = fosfoenolpiruvato;
Pi = fosfato inorgânico;
PK = piruvato kinase;
p-NP = p-nitrofenol;
p-NPP = p-nitrofenilfosfato;
TBA = ácido tiobarbitúrico;
TCA = ácido tricloro acético;

3.4-ISOLAMENTO DA H^+ -ATPASE DE CLOROPLASTO DE ESPINAFRE

A preparação da enzima foi realizada através do método descrito por PICK & RACKER (1979), com algumas modificações descritas por FROMME *et al.* (1987), que consiste em ultracentrifugações diferenciais, precipitação em sulfato de amônia e purificação através de um gradiente de sacarose.

3.5-DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

O método utilizado foi descrito por LOWRY *et al.*, (1951) e posteriormente modificado por MARKWELL *et al.*, (1978). Procedimento: em tubos de ensaio adiciona-se: 750 μ L de solução alcalina com 0,01% de $CuSO_4$ e tartarato 0,02%; albumina (1mg/mL), que é utilizada para a obtenção da curva-padrão de proteína, em volumes que variam de 5 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 30 μ L e 40 μ L, para cada um dos cinco tubos, omitindo a adição de albumina em um sexto tubo (branco); H_2O (deionizada) q.s.p. 1mL, e incuba-se por 15 minutos. Após esse período, acrescenta-se 75 μ L de Folin a 50% em cada tubo, e após incubação por mais 45 minutos, mede-se a absorbância em 660 nm. Este processo é realizado em triplicata, com a adição da CF_0F_1 solúvel ao invés de albumina, para a obtenção de um ponto médio que, por interpolação no gráfico, nos indicará a concentração da proteína em questão.

3.6-RECONSTITUIÇÃO DA CF_0F_1 EM VESÍCULAS DE ASOLECITINA PELO MÉTODO DE DIÁLISE

Esta metodologia procura reconstituir a morfologia existente nas membranas tilacóides dos cloroplastos, onde o ATP é sintetizado pela CF_0F_1 .

A reconstituição desta enzima, em vesículas de asolecitina, foi realizada conforme o método descrito por SONE *et al.*, (1977). A preparação das soluções, bem como o método da diálise, serão descritos nos itens a seguir:

3.6.1-Solubilização dos lipídeos

Prepara-se o tampão de solubilização, com 10 mM de Tricina, 20 g/L de Colato de sódio, 10 g/L de Desoxicolato de sódio, 0.5 mM de DTT e 0,1 mM de EDTA. Os lipídeos (asolecitina) são, então, dissolvidos neste tampão, com a ajuda do ultra-som (3 vezes por 30s, força 50%, nível 5 na primeira vez, e nível 3 nas outras duas vezes).

3.6.2-Reconstituição da CF₀F₁ em lipossomas

Preparam-se 2 litros de uma solução tampão com 1mM de Tricina, 0,25 mM de MgCl₂ e 0,02 mM de EDTA. O pH deve ser ajustado em 8,0 com NaOH. Além disso, adiciona-se 5 mL de solução 100 mM de DTT. A diálise é realizada em um recipiente contendo uma membrana de 500 Da de poro (Dianorne®), sendo acrescentados neste recipiente 450 µL de asolecitina (50 mg/mL), juntamente com uma preparação de CF₀F₁ (50 µL). Esta preparação é então dialisada contra um volume de dois litros do tampão a 30⁰C por 5 horas, sob constante agitação. Ao retirar os proteolipossomos, mede-se o volume, pois é necessário para cálculos posteriores. O tampão para a diálise pode ser preparado 10 vezes concentrado e estocado congelado (-20⁰C), em alíquotas de 200 mL para posterior diluição. Os lipídeos (asolecitina) são solubilizados no tampão de solubilização e congelados (-20⁰C) em pequenas alíquotas.

3.7-MEDIDA DA ATIVIDADE DE SÍNTESE DE ATP PELA CF_0F_1 RECONSTITUÍDA EM LIPOSSOMAS, COM ATIVAÇÃO PELA TRANSIÇÃO ÁCIDO-BÁSICA ATRAVÉS DA MEMBRANA ($\Delta pH/\Delta \phi$)

A ATPase (CF_0F_1), na presença de ADP e P_i , deve sintetizar ATP quando uma diferença de potencial transmembrana é aplicada, de acordo com a teoria proposta por MITCHELL (1974). Para medir-se a síntese de ATP, constrói-se um sistema que apresente um $\Delta pH/\Delta \phi$ entre os lados internos e externos dos proteolipossomas, pois a CF_0F_1 necessita da passagem de H^+ pelo seu canal transmembrana (porção F_0), para ser ativada e, assim, catalisar a reação entre ADP e P_i (fosfato inorgânico) na produção de ATP.

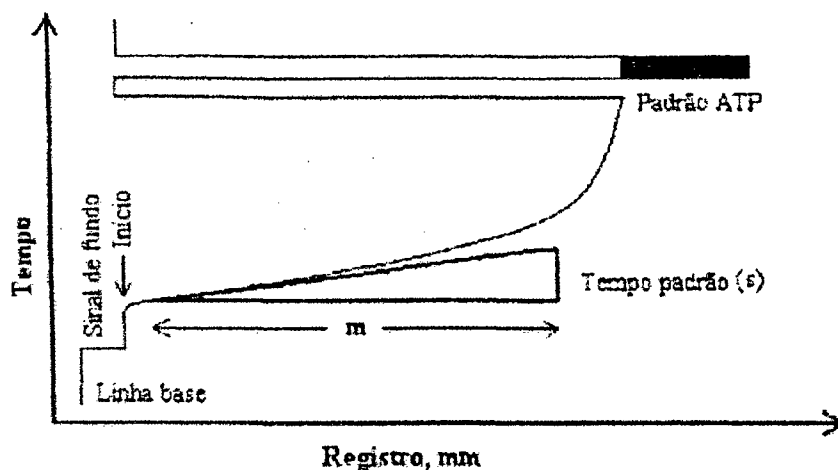
3.7.1-Síntese de ATP pelo método de um passo

Um potencial eletroquímico ($\Delta \mu H^+$) é aplicado aos proteolipossomas com a adição subsequente de tampões com pH ácido e baixa concentração de íons K^+ , seguido de um tampão com pH alcalino e alta concentração de íons K^+ . A quantidade de ATP produzida pela enzima é então medida por bioluminescência. Para o caso da enzima reconstituída em lipossomas o ΔpH é aplicado da seguinte maneira:

a) Prepara-se a **solução I** com 20 mM de succinato, 5 mM de NaH_2PO_4 , 2,5 mM de $MgCl_2$ e 0,6 mM de KOH, e ajustando-se o pH em 4,9 pela adição de HCl. Momentos antes do experimento, valinomicina (ionóforo de potássio) em solução a 20 mM deve ser adicionada à solução I na proporção de 1 $\mu L/mL$ de solução. Obs. A valinomicina é dissolvida em etanol.

b) Prepara-se a **solução II** com 200 mM de Tricina, 5 mM de NaH_2PO_4 , 2,5 mM de MgCl_2 e 120 mM de KOH, e ajustando-se o pH em 8,7 pela adição de NaOH. Momentos antes do experimento, uma solução de ADP 20 mM deve ser adicionado à solução II na proporção de 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de solução.

c) Em uma cubeta especial para leitura no luminômetro, são colocadas 240 μL de solução II juntamente com 20 μL de luci-kit, e o primeiro registro é obtido pelo registrador, acoplado ao aparelho, calibrado com velocidade de 0.1mm/s. Em seguida prepara-se uma solução contendo 240 μL de solução I e 20 μL de proteolipossomas e incuba-se a mistura por dois minutos. Após esse período adiciona-se, com uma seringa de 1 mL, a solução de proteolipossomas à solução que se encontra na cubeta dentro do luminômetro, e imediatamente é feito um novo registro. Devido à rapidez da reação, o registrador deve apresentar uma velocidade de 10 mm/s. Espera-se então até que a curva de síntese demonstrada no registrador alcance o estado estacionário e retoma-se a velocidade de 0,1 mm/s. O $\Delta\phi$ é aplicado simultaneamente ao ΔpH , pois a solução I contém alta concentração de H^+ e baixa concentração de K^+ , além de valinomicina (ionóforo para K^+). Enquanto que a solução II contém baixa concentração de H^+ e alta concentração de K^+ . Quando os proteolipossomas são incubados com a Solução I, ocorre um equilíbrio da concentração de H^+ (alto H^+ e baixo K^+ no interior das vesículas) e, ao adicionar-se a solução II, os íons K^+ entram rapidamente através da valinomicina nos proteolipossomas, aumentando a velocidade da saída dos prótons (H^+) pelo canal da enzima, incrementando assim a velocidade de síntese de ATP. A diferença de pH e de concentração de K^+ propiciam a formação do $\Delta\mu\text{H}^+$, resultando na ativação da ATPase para a síntese de ATP com a velocidade otimizada; retira-se a cubeta do luminômetro e adicionam-se 10 μL de ATP padrão (normalmente 10^{-6} M) registrando-se novamente o traçado à velocidade de 0,1 mm/s. Os registros decorrentes dos diversos ensaios podem ser elucidados no diagrama padrão apresentado abaixo:



O ATP sintetizado é calculado utilizando-se da seguinte equação:

$$S = \frac{m V_{ST} V_1 C_{ST}}{ES V_L V_2 C_E}$$

Em que:

m = tangente

ES = diferença entre o sinal da solução padrão registrado e a amostra

V_{ST} = volume do ATP padrão (10 μ l)

V_L = volume de proteolipossomas (20 μ l)

V_1 = volume da solução I + volume da solução II + volume do luci-kit + V_L (520 μ l)

V_2 = $V_1 + V_{ST}$ (530 μ l)

C_{ST} = concentração do ATP padrão (10^{-6} M)

C_E = concentração da proteína após a diálise em Molar.

S = ATP sintetizado [(mol ATP)/(mol CF_0F_1 / s)]

3.7.2-Síntese de ATP pelo método de dois passos

Adicionam-se 50 μ L de solução I em um tubo de ensaio, sob agitação, seguidos da adição de 10 μ L de proteolipossomas (pH resultante = 5,1).

Espera-se dois minutos até o interior das vesículas igualar o pH com o meio exterior.

Adicionam-se 60 μ L de solução II (pH resultante = 8,7), aplicando-se desta forma um Δ pH de

3,4. A reação é interrompida no tempo desejado (normalmente entre 0 e 2 segundos) com a adição de 100 μL de ácido tricloroacético 4% (TCA). Este procedimento é realizado em triplicata para cada intervalo de tempo.

Previamente deve ser feito o controle, com a adição das soluções na seguinte ordem: 50 μL de Solução I, 10 μL de proteolipossomos, 100 μL de TCA e 60 μL de solução II.

3.7.3-Leitura dos resultados

A técnica utilizada para medir a concentração de ATP produzida baseia-se na propriedade de um complexo enzimático (luciferina/luciferase) emitir luz ao reagir com ATP na presença de O_2 . Adiciona-se a uma cubeta 200 μL do tampão (Tris-HCl pH 8,0) e 50 μL do Kit com luciferina/luciferase, que é responsável pela luminescência na presença de ATP, juntamente com 10 μL da amostra. É realizada então a primeira leitura no luminômetro e o respectivo registro (registrador acoplado ao luminômetro). Adicionam-se então 5 μL de solução 10^{-5}M , 10^{-6}M ou 10^{-7}M de ATP padrão. Os resultados registrados, decorrentes das diversas leituras, são repassados para um programa de computador que calcula as quantidades de ATP presentes em cada amostra, fornecendo o resultado em mol ATP/mol de CF_0F_1 .

3.8-MEDIDA DE NUCLEOTÍDEOS LIVRES E LIGADOS À ENZIMA E LIBERAÇÃO DESTES

3.8.1-Medida de nucleotídeos livres e ligados

Este método visa medir a quantidade de ATP e ADP presentes no meio da preparação da CF_0F_1 e ligados na enzima. Toma-se uma alíquota da preparação (enzima solúvel), ou dos proteolipossomas, e mede-se a concentração de ADP e ATP livres. Com a desnaturação da proteína com TCA 4%, tanto ADP como ATP são liberados. Mede-se então a concentração total dos nucleotídeos no meio, depois de neutralizar-se o meio com NaOH 1N. A quantidade de nucleotídeos ligados é obtida pela diferença entre a quantidade total e a quantidade livre, medida antes da desnaturação. Para a medida da concentração de ADP, tanto livre como ligado, adiciona-se PEP e PK; esta enzima converte ADP em ATP que é, então, detectado. A quantidade de ADP é então calculada pela subtração dos valores obtidos com e sem o sistema PEP/PK (CRECZYNSKI-PASA & GRÄBER, 1994).

$$[ADP] = ([ATP] \text{ com PEP/PK} - [ATP] \text{ sem PEP/PK})$$

3.8.2-Medida da liberação de nucleotídeos provocada pela ativação da CF_0F_1 pela transição ácido-básica através da membrana ($\Delta pH/\Delta \phi$)

Esta etapa visa mostrar que a enzima no estado ativado pelo $\Delta pH/\Delta \phi$, é capaz de mudar seu estado conformacional e, desta forma, liberar nucleotídeos até então nela ligados. Repete-se a preparação das soluções 1 e 2 como explicado para a síntese de ATP, porém nem uma nem outra deve conter NaH_2PO_4/ADP (CRECZYNSKI-PASA & GRÄBER, 1994).

3.8.2.1-Liberação de ATP

Adicionam-se 50 µl de solução I e 10 µL de proteolipossomas em um tubo. Espera-se 2 minutos e adicionam-se mais 60 µL da solução II. Após o tempo desejado (15 segundos), adiciona-se 100 µL de NH₄Cl para desacoplamento do potencial transmembrana. Retira-se do tubo de ensaio uma alíquota de 100 µL e adiciona-se a 100µL de tampão luciferina-luciferase (Tris-HCl pH 8,0) e 50 µL do kit luciferina-luciferase, pipetados previamente em uma cubeta. Registra-se o sinal antes e depois da adição da amostra-padrão de ATP.

3.8.2.2-Liberação de ADP

Repetem-se os mesmos passos da liberação de ATP. Adiciona-se também na cubeta, 5 µL de PEP 0,1 M e 5 µL de PK 10 mg/mL.

Para medida da liberação de ATP e ADP, logo após a adição da solução básica, espera-se 15 segundos. Posteriormente, toma-se uma alíquota para medir a concentração do ADP, com PEP e PK. Em um teste em separado, mede-se a concentração do ATP liberado. São tomados os cuidados de medir-se as concentrações dos nucleotídeos livres contaminantes. O controle é feito misturando-se a solução ácida com a solução básica previamente à adição da amostra. O valor deste ponto deve ser descontado do total da concentração de cada nucleotídeo liberado. As condições do meio de reação para medir a liberação de nucleotídeos podem ser alteradas, dependendo do estudo a ser feito (CRECZYNSKI-PASA & GRÄBER, 1994).

3.9-MEDIDA DO EFEITO DE DIFERENTES COMPOSTOS FOSFORILADOS SOBRE A CF_0F_1 .

3.9.1- Sobre a atividade de síntese de ATP

A medida de síntese de ATP foi realizada conforme descrito acima, porém foram acrescentados nas soluções I e II os diferentes compostos fosforilados e não-fosforilados. As concentrações dos compostos foram aumentadas gradualmente (entre 0 e 3 mM), como mostradas em cada figura.

3.9.2-Sobre a atividade fosfatásica

A atividade fosfatásica foi medida de acordo com CRECZYNSKI-PASA *et al.* (1997), que consiste na hidrólise de p-nitrofenilfosfato (p-NPP) pela CF_0F_1 , quantificando o aparecimento de p-nitrofenol (p-NP), produto da hidrólise do p-NPP, que é analisado em $\lambda = 415\text{nm}$, no espectrofotômetro acoplado a um registrador. O tempo de reação é de aproximadamente 10 minutos. O meio de hidrólise contém 5 mM de $MgCl_2$, 100 mM de KCl e 100mM de Tris (pH 7,0), 10 μ L da CF_0F_1 e 20 mM de p-NPP, num volume final de 200 μ L. O coeficiente de absorção para o p-NP a pH 7,0 é $\epsilon_{415} = 5700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A partir do registro, calcula-se a velocidade de hidrólise de p-NPP por meio de sua inclinação, da seguinte maneira:

$$v = \frac{\Delta Do}{t \cdot \Sigma . e}$$

v= velocidade de hidrólise do p-NPP (nM de p-NP/mg de enzima/h)

ΔDo = diferença de absorbância, no período de tempo

Σ = coeficiente de absorção do p-NPP = 5700/M

t = tempo

e = concentração da enzima no ensaio

A hidrólise do p-NPP foi realizada conforme descrito acima, porém os diferentes compostos nas concentrações desejadas (0 a 2,5 mM) foram adicionados ao meio de reação da enzima num volume final de 200 μ l.

3.10-PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS PARA O ESTUDO DO EFEITO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DE NITROGÊNIO

A preparação dos lipossomas de asolecitina foi realizada conforme o método de reconstituição da CF₀F₁ descrito por SONE *et al.* (1977), com algumas modificações, não sendo adicionados EDTA e DTT no meio de diálise. EDTA é evitado por interferir nos ensaios com radical hidroxil e o DTT por ser um agente redutor, podendo interferir nas reações de oxi-redução, de uma forma geral nos ensaios com EROS e ERNS.

A diálise foi realizada conforme já descrito, porém somente a solução de fosfolipídios (asolecitina 50 mg/mL, num volume de 1mL) foi adicionada no recipiente de diálise. Os lipossomas obtidos após esse processo, foram utilizados para os experimentos de peroxidação lipídica. Para os experimentos de permeabilidade, os lipossomas foram preparados da mesma forma como descrito acima, diferentemente somente, pela adição de azul de metileno (0,01 mM) ao meio onde os lipídeos encontravam-se solubilizados e ao meio de diálise.

3.10.1-Lavagem dos lipossomas reconstituídos na presença de azul de metileno

Os lipossomas produzidos através do processo de reconstituição na presença de azul de metileno (0,01mM), foram lavados, utilizando meio de diálise para a retirada do excesso do corante. Para isso, foram colocados em tubos de ensaio e centrifugados por 3 minutos a 10000 g. O procedimento foi repetido 3 vezes.

3.10.2-Controle da incorporação de azul de metileno

Os lipossomas, após as lavagens, foram tratados e incubados por 1 hora com diferentes concentrações de Triton X-100 (0,1%, 0,3% e 0,5%). Aliquotas de 1 mL de lipossomas, de cada tratamento foram colocadas em microtubos , a cada 10 minutos, foram centrifugadas durante 3 minutos a 10000 g. Após a centrifugação, uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi retirada e monitorada espectrofotometricamente a 668 nm. Os precipitados dos ensaios eram ressuspensos, e este procedimento foi repetido em intervalos de 10 minutos.

Paralelamente, foi realizado um controle da permeabilidade ao azul de metileno com lipossomas não tratados com Triton X-100, sendo seguido o mesmo procedimento descrito acima.

3.10.3-Preparação dos lipossomas para ensaios de permeabilidade e peroxidação lipídica

Diferentes sistemas produtores de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs) foram adicionados aos lipossomas. Para os testes de permeabilidade, foram utilizados

os lipossomas reconstituídos na presença de azul de metileno 0,01 mM, e para os testes de peroxidação lipídica foram utilizados os lipossomas preparados na ausência do corante.

3.11-ENSAIOS DE PERMEABILIDADE

3.11.1-Utilização do monóxido de nitrogênio (NO^{*}) e *tert*-butilhidroperóxido

Um volume de 1mL dos lipossomas obtidos na presença de azul de metileno, após as lavagens, foram incubados com 100 mM de nitroprussiato de sódio (doador de NO); o mesmo volume foi utilizado para o tratamento com *tert-butil*-hidroperóxido 5% e os ensaios foram incubados por uma hora. Ambos ensaios foram, então, centrifugados em intervalos de 10 minutos, durante 3 minutos a 10000 g, e, após a centrifugação, 100 µL do sobrenadante foram retirados e monitorados espectrofotometricamente a 668nm (GREEN *et al.*, 1982).

3.11.2-Utilização dos radicais hidroxil (•OH) e ascorbil

Foram utilizados para estes estudos o sistema de geração do radical hidroxil, FeCl₃ + ascorbato + H₂O₂), e o sistema de geração do radical ascorbil, FeSO₄ + ascorbato, sem a adição de peróxido de hidrogênio, segundo CASALINO, SBLANO & LANDRISCINA (1996).

Os experimentos de permeabilidade utilizando o ascorbil foram realizados da seguinte maneira: 100 µL dos lipossomas preparados com azul de metileno, após as lavagens, foram

incubados com 25 μM de FeSO_4 , 500 μM ácido ascórbico, 0,1 M de tampão Tris-HCl (pH 7,4) e H_2O (deionizada) q.s.p 200 μL , sendo a mistura então incubada por uma hora em banho-maria a 37°C e, posteriormente centrifugadas a 10000 g. O sobrenadante de cada ensaio foi monitorado espectrofotometricamente a 668 nm, para a possível detecção de azul de metileno.

Na presença do radical hidroxil, os lipossomas foram incubados com 20 μM de FeCl_3 , 0,1 mM de ácido ascórbico, 10 mM KH_2PO_4 (pH, 7,4), 2,8 mM de H_2O_2 e H_2O (deionizada) q.s.p 200 μl e o procedimento acima descrito foi repetido.

Para ambos os sistemas, foram realizados os ensaios-controle com lipossomas sem tratamento.

3.11.3-Utilização do peroxinitrito (ONOO^-)

A produção de peroxinitrito foi realizada conforme o método “quenched-flow synthesis” a partir da modificação do “quenched flow reaction” (KOPPENOL *et al.*, 1996). Esta metodologia consiste na produção do peroxinitrito através da reação entre 0,6 M de NaNO_2 , 0,6 M de H_2O_2 em 0,7 M de HCl e 0,9 M de NaOH. Todas as soluções devem ser preparadas momentos antes da reação e conservadas a 0°C .

Uma bomba de vácuo é utilizada para succionar o nitrito de sódio, o peróxido de hidrogênio e a solução de hidróxido de sódio através de uma tubulação de vidro que conecta as diferentes soluções. Na primeira junção entre os tubos, o peróxido de hidrogênio (acidificado com HCl) mistura-se com o nitrito de sódio (formando o hidrogênio oxoperoxinitrato), sendo esse fluxo encaminhado a uma junção em forma de “T” conectando

a mistura ao conteúdo de um terceiro frasco (peróxido de hidrogênio), resultando na formação do peroxinitrito, que é encaminhado então a um frasco de coleta.

Os 3 frascos de estocagem de reagentes e o frasco de coleta devem estar mergulhados em banho de gelo e a vazão de cada um dos três frascos deve ser ajustada para 10 mL/s, devendo todos os frascos ser bem vedados.

A concentração final do peroxinitrito varia entre 160 a 185 mM, devendo esta solução ser estocada em alíquotas, a -80°C , podendo ser utilizada por até duas semanas.

Os lipossomas (100 μl) reconstituídos na presença de azul de metileno, após as lavagens conforme descrito anteriormente, foram incubados com peroxinitrito (50, 100, 300, 500 e 1000 μM) por uma hora, sendo posteriormente centrifugados a 10000g. Os sobrenadantes dos diferentes ensaios foram então analisados espectrofotometricamente a 668nm.

3.12-ENSAIOS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

3.12.1-Avaliação da lipoperoxidação em lipossomas

A avaliação da peroxidação lipídica em lipossomas foi realizada em triplicatas, através da detecção a 535 nm dos derivados de seus produtos de oxidação, por substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o malondialdeído, ou MDA, produzindo uma base de Schiff de coloração rósea (BIRD & DRAPER, 1984).

Os lipossomas obtidos sem a presença do azul de metileno foram tratados com o radical hidroxil, ($\text{FeCl}_3 + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{ascorbato}$) e o radical ascorbil ($\text{FeSO}_4 + \text{ascorbato}$), e

peroxinitrito nas concentrações de 50, 100 e 300 μ M. O monóxido de nitrogênio (óxido nítrico) foi obtido a partir da incubação dos lipossomas com o nitroprussiato de sódio (100 e 150 mM), e, após as pré-incubações foram adicionados em cada amostra, TCA 12% e TBA 0.73%, na proporção de 1:1:1. As amostras eram então levadas ao banho-maria por 40 minutos a 100°C e, em seguida, eram centrifugadas por 3 minutos a 10000g, sendo os sobrenadantes analisados. Grupos controle (lipossomas sem tratamento) e os brancos (reagentes e H₂O) foram submetidos ao mesmo procedimento.

Paralelamente, foi analisada ainda a peroxidação lipídica provocada pelo radical hidroxil e pelo radical ascorbil em microssomas de fígado de rato, para uma posterior análise comparativa aos danos oxidativos provocados pelas mesmas espécies reativas em lipossomas de asolecitina.

3.12.2-Avaliação da lipoperoxidação em microssomas

Os microssomas de fígado de rato foram obtidos por centrifugações diferenciais pela agregação com cálcio. Os fígados foram homogeneizados em um tampão contendo 17% de tecido, 10 mM de Tris-sacarose pH 7,4, e centrifugados a 600 g por 5 minutos a 0°C. A fração mitocondrial foi obtida do sobrenadante e centrifugada a 12000 g por 10 minutos. A fração microssomal foi obtida pela precipitação do sobrenadante da fração mitocondrial usando 8 mM de CaCl₂. O precipitado foi então lavado com 15 mM de KCl / 10 mM de Tris pH 7,4, e centrifugado a 25000g por 15 minutos. Depois de lavados, os microssomas foram ressuspensos em 20 % de glicerol em tampão fosfato 0,1 M (Na₂HPO₄) (SCHENKMAN & CINTI, 1978). A fração foi então congelada em nitrogênio líquido para posterior análise e determinação da concentração de proteína.

Os microssomas foram tratados em paralelo aos ensaios com os lipossomas, conforme o procedimento já descrito em **3.11.2**.

3.13-ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados dos ensaios com peroxidação lipídica foi realizada através de análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Duncan, admitindo um nível de significância de $p < 0,05$. Os demais resultados estão apresentados como média + erro-padrão da média, de vários experimentos.

4- RESULTADOS

4.1-MEDIDA DA LIBERAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS PROVOCADA PELA ATIVAÇÃO DA CF_0F_1

Nos experimentos de determinação do número de nucleotídeos ligados na enzima e livres no meio, verificou-se que a nossa preparação apresenta 2 ± 0.12 ATP/mol CF_0F_1 e 1 ± 0.07 ADP/mol CF_0F_1 ligados, e não apresentam concentrações detectáveis de nucleotídeos livres.

4.2-MEDIDA DA SÍNTESE DE ATP

Uma técnica de rotina utilizada para avaliar a viabilidade da preparação de proteolipossomas é a verificação da atividade de síntese de ATP.

Neste trabalho foram implementadas duas metodologias para medir a síntese de ATP, ambas úteis, dependendo do tipo de experiência que se deseja realizar, sendo o princípio básico o mesmo para as duas, ou seja, a ativação da enzima é realizada pela implementação de um potencial eletroquímico através da membrana bilipídica. A primeira metodologia, é utilizada para experimentos envolvendo aspectos cinéticos. A segunda metodologia, mais utilizada, é para aspectos cinéticos envolvendo efeitos fenomenológicos, como, por exemplo,

o estudo realizado neste trabalho, o qual, verificou a influência de diferentes substâncias na atividade da enzima.

Inicialmente, a síntese de ATP era realizada pelo processo de duas etapas, a primeira, a síntese propriamente dita e, posteriormente, a leitura do resultado no luminômetro. O resultado obtido com este método está mostrado na Figura 1. É possível notar que são necessários somente cerca de 2 segundos para que o sistema alcance o equilíbrio, mostrando sua atividade catalítica durante o estado ativado, ou seja, enquanto houver fluxo de prótons pelo seu canal transmembrana.

Neste tipo de reconstituição e condições experimentais, o gradiente eletroquímico é rapidamente dissipado. A produção de ATP é reduzida rapidamente, chegando a um valor máximo em 2 segundos. O curso temporal pode ser descrito com a seguinte equação:

$$ATP = ATP_{\max}(1 - \exp(-kt)) + ATP_{\text{controle}}$$

em que:

ATP é a concentração de ATP no tempo t , e ATP_{\max} é a concentração máxima do novo ATP sintetizado. Os dados foram submetidos a uma regressão não linear com ATP_{\max} e k como parâmetros livres. A velocidade inicial foi então calculada a partir de ATP_{\max} e k (240 mol ATP/mol CF_0F_1 /s) (Figura 1).

No segundo método, utilizou-se uma agulha diretamente dentro do aparelho de leitura, o que faz com que o processo de síntese e a leitura do resultado ocorram em somente uma etapa. Um diagrama correspondente a essa técnica encontra-se ilustrado em Materiais e Métodos (página 20).

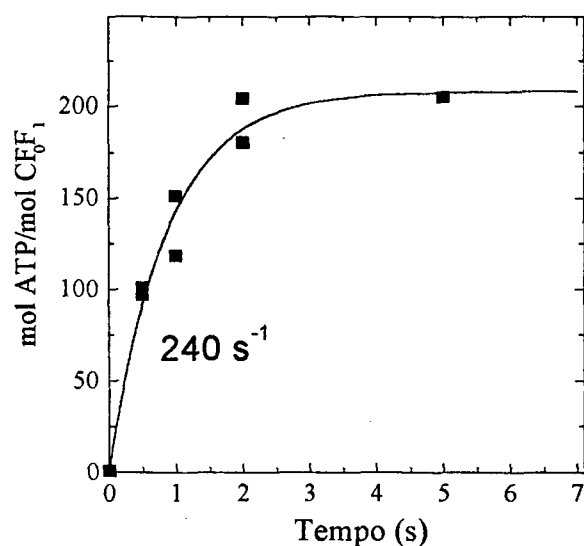


Figura 1 - Curva da velocidade de síntese de ATP. pela tangente da parte inicial da reta calcula-se a velocidade de síntese de ATP (240 mol de ATP/ mol de enzima/s). Método de dois passos, como explicado em Materiais e Métodos.

4.3-COMPOSTOS FOSFORILADOS, NÃO SUBSTRATOS, TESTADOS NAS ATIVIDADES DE SÍNTESE DE ATP E HIDRÓLISE DE P-NPP PELA CF₀F₁.

Diferentes compostos fosforilados (não substratos), como o vanadato, um análogo do fosfato, e a adenosina foram testados nas atividades de síntese de ATP e hidrólise de p-NPP pela CF₀F₁. Os compostos utilizados, bem como suas fórmulas estruturais, estão mostrados na tabela abaixo.

Adenosina	
-----------	--

ADP*	
AMP	
Fosfato e Vanadato*	
Fosfoserina	
Pirofosfato**	

* Compostos testados somente na atividade fosfatásica da CF_0F_1

** Composto testado somente na atividade de síntese de ATP pela CF_0F_1

Tabela 1- Compostos testados nas atividades de síntese de ATP e fosfatásica da CF_0F_1 e suas respectivas fórmulas estruturais.

4.3.1-Estudo do efeito dos compostos fosforilados, não substratos, na atividade de síntese de ATP.

O estudo sobre o efeito dos compostos fosforilados na atividade de síntese de ATP foi realizado, utilizando-se a técnica de um passo. Na Figura 2 mostra o efeito de AMP inibindo fortemente a enzima, com um $K_{0,5} = 0,48 \pm 0,07$ mM calculado pela inibição de 50% da atividade. Os efeitos de ATP e ADP não foram estudados, pois o primeiro é substrato da enzima nesta reação, e o segundo é o produto da atividade catalítica da mesma.

Foi testado também o efeito de adenosina na atividade de síntese de ATP. Esta molécula faz parte dos nucleotídeos de adenina, diferindo apenas por não conter o grupamento fosfato.

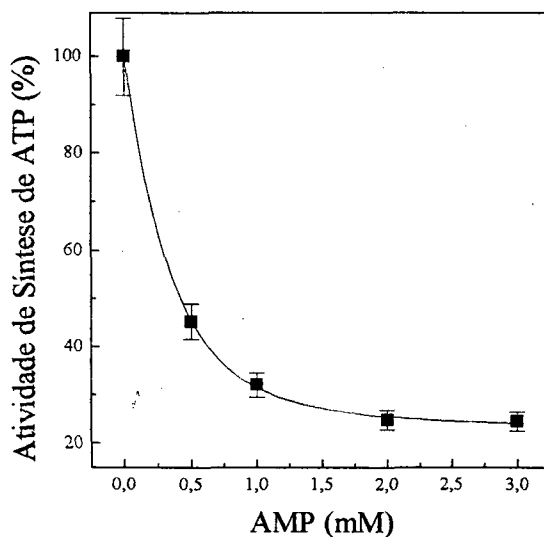


Figura 2 - Influência de AMP na velocidade de síntese de ATP. O gráfico foi obtido a partir de 5 curvas independentes, cada ponto equivale a uma curva em que se mede a velocidade de síntese de ATP conforme descrito em Materiais e Métodos. As concentrações de AMP estão mostradas na figura.

Como se observa na Figura 3, a adenosina, constituindo somente a parte orgânica dos nucleotídeos de adenina, não exerceu efeito inibitório significativo na síntese de ATP.

Na Figura 4 está apresentado o efeito do pirofosfato sobre a síntese de ATP. O pirofosfato é um composto inorgânico, contendo dois grupamentos fosfato, sem uma parte orgânica na molécula, relacionando-se aos nucleotídeos de adenina, substratos da enzima. Observou-se neste caso uma forte inibição ($K_{0,5} = 0,45 \pm 0,06$ mM), resultado similar ao que foi obtido com AMP.

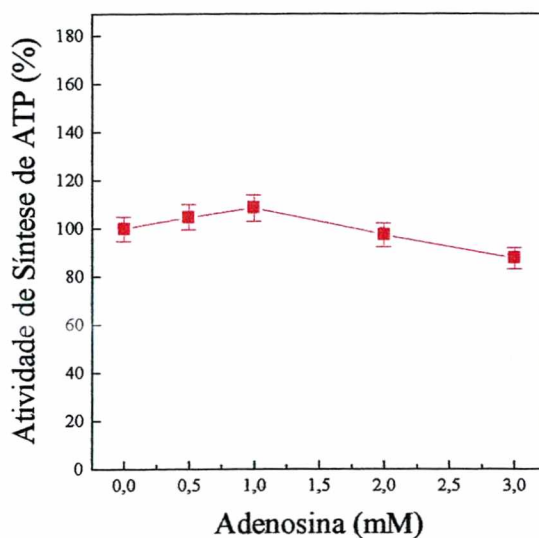


Figura 3 - Influência de adenosina na velocidade de síntese de ATP. O gráfico foi obtido a partir de 5 curvas de síntese independentes; cada ponto equivale a uma curva em que se mede a velocidade de síntese de ATP como descrito em Materiais e Métodos. As concentrações de adenosina estão mostradas na figura.

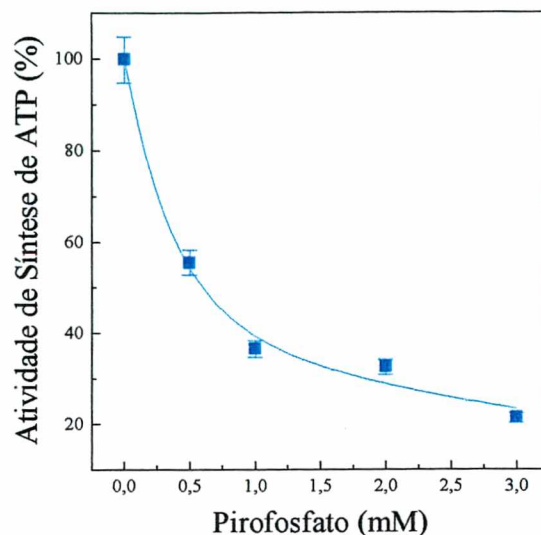


Figura 4 - Influência de pirofosfato na velocidade de síntese de ATP. o gráfico foi obtido a partir de 5 curvas de síntese independentes; cada ponto equivale a uma curva em que se mede a velocidade de síntese de ATP. As concentrações de pirofosfato estão mostradas na figura.

A fosfoserina foi testada por ser uma molécula orgânica, com um grupamento fosfato, mas não um nucleotídeo de adenina. Observou-se que este tipo de molécula também foi capaz de inibir a síntese de ATP com a mesma potência que o AMP e o pirofosfato ($K_{0,5} = 0,5 \pm 0,05$ mM) (Figura 5).

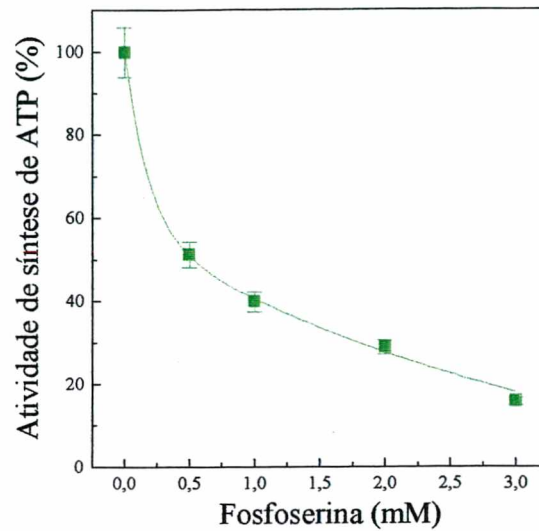


Figura 5 - Influência de fosfoserina na velocidade de síntese de ATP. O gráfico foi obtido a partir de 5 curvas independentes; cada ponto equivale a uma curva em que se mede a velocidade de síntese de ATP. As concentrações de fosfoserina estão mostradas na figura.

ADP e vanadato não foram testados na atividade de síntese de ATP, pois ADP é substrato da enzima nesta reação e o vanadato interferiu no método de detecção.

Para melhor comparação dos resultados, na Figura 6 todas as curvas em um mesmo gráfico estão apresentadas.

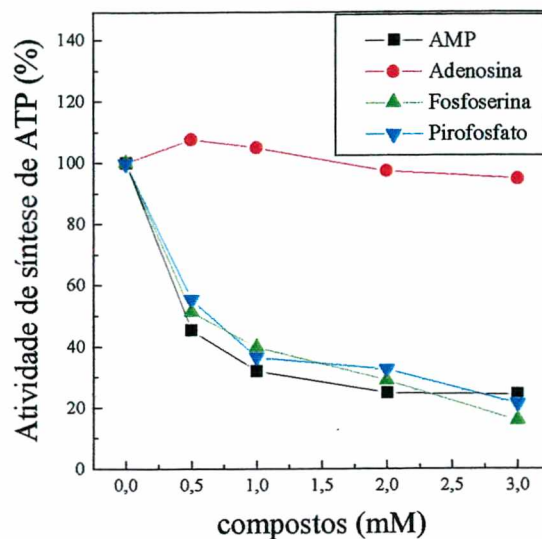


Figura 6 - Gráfico relacionando o efeito de AMP, adenosina, fosfoserina e pirofosfato na atividade de síntese de ATP. O gráfico foi obtido através da sobreposição das curvas anteriores para mostrar possíveis relações entre os diferentes compostos testados.

Tabela 2- Constantes de inibição relacionadas ao efeito de diferentes compostos sobre a atividade de síntese de ATP pela CF_0F_1 .

Compostos	$K_{0,5}$ (mM)
AMP	$0,48 \pm 0,007$
Pirofosfato	$0,45 \pm 0,06$
Fosfoserina	$0,5 \pm 0,05$
Adenosina*	-

* A adenosina não apresentou efeito inibitório significativo na atividade de síntese de ATP

4.3.2-Efeito do AMP, ADP, adenosina, fosfoserina e vanadato na atividade de hidrólise do p-NPP.

Todos estes compostos fosforilados, AMP, ADP, fosfoserina, e o pirofosfato, foram testados também na atividade fosfatásica da CF_0F_1 , além de adenosina e vanadato. Os resultados estão apresentados na Figura 7.

Na Figura 8 (A), os resultados retratam o efeito direto de AMP na atividade fosfatásica da CF_0F_1 , e na Figura 8 (B), estão mostrados na forma indireta, através do Plot de Dixon, que propicia a análise dos aspectos qualitativos e quantitativos da inibição enzimática. Realizou-se esta análise para todos os compostos testados nesta atividade com exceção do vanadato, e os resultados estão sendo mostrados nas figuras subsequentes.

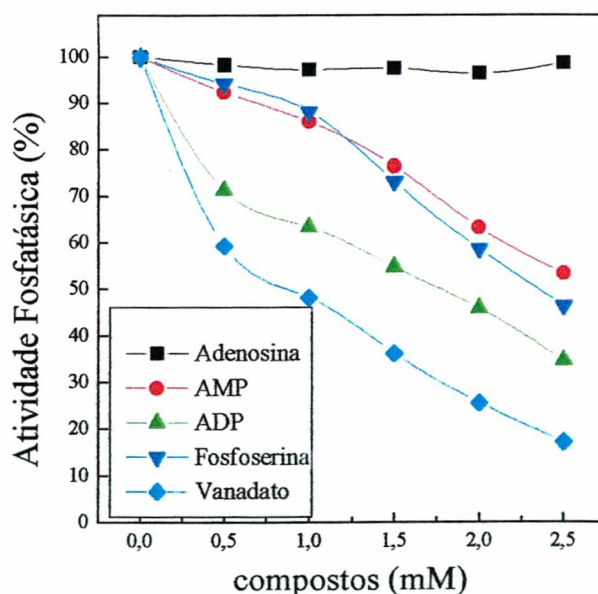


Figura 7 - Gráfico relacionando o efeito do AMP, ADP, Adenosina, fosfoserina e vanadato na atividade de hidrólise de p-NPP. A hidrólise de p-NPP foi realizada como descrito em Materiais e Métodos. O gráfico foi obtido a partir de 3 curvas independentes para cada ponto, com concentrações variadas dos diferentes compostos (mostradas na figura).

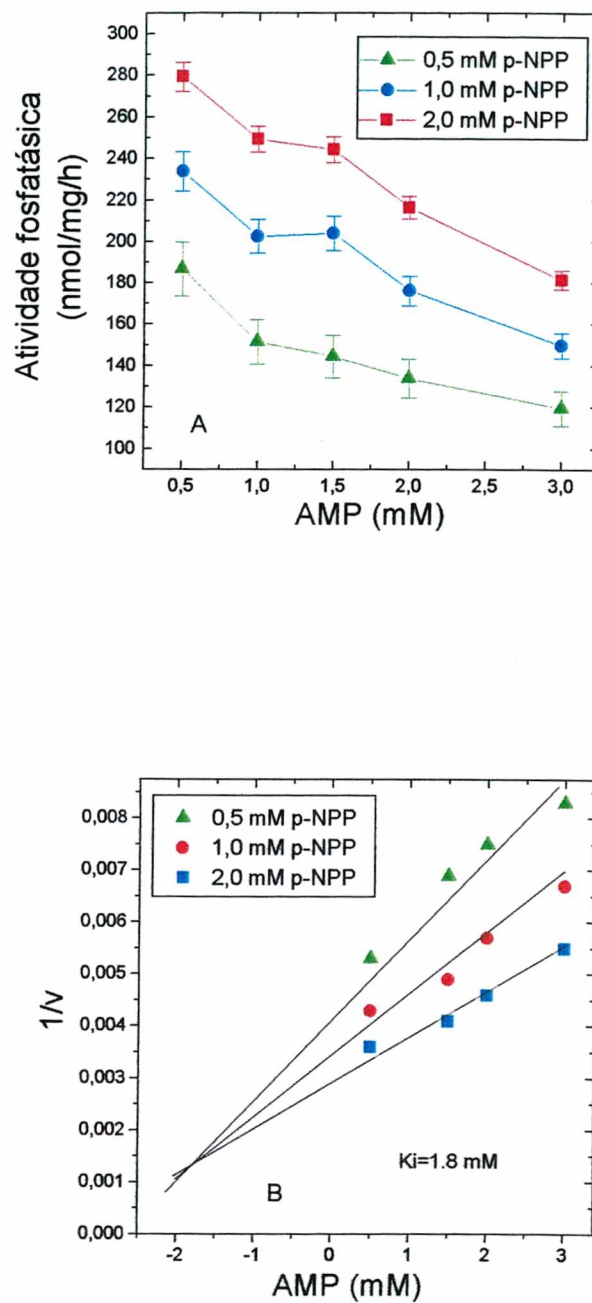


Figura 8 - Efeito de AMP na velocidade de hidrólise de p-NPP. (A) a hidrólise de p-NPP foi realizada como descrito em Materiais e Métodos, utilizando AMP e p-NPP nas concentrações apresentadas na figura. (B) Plot de Dixon.

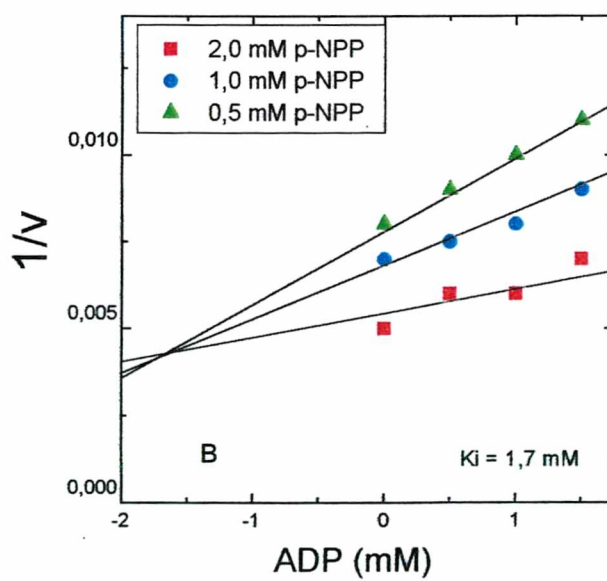
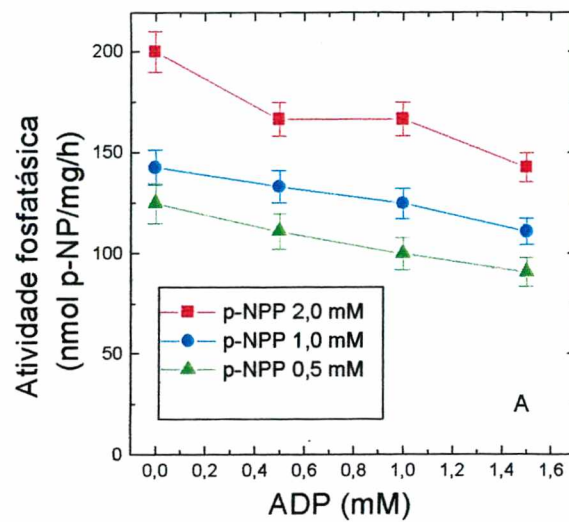


Figura 9 - Efeito de ADP na velocidade de hidrólise de p-NPP. (A) a hidrólise de p-NPP foi realizada como descrito em Materiais e Métodos, utilizando ADP e p-NPP nas concentrações apresentadas na figura. (B) Plot de Dixon.

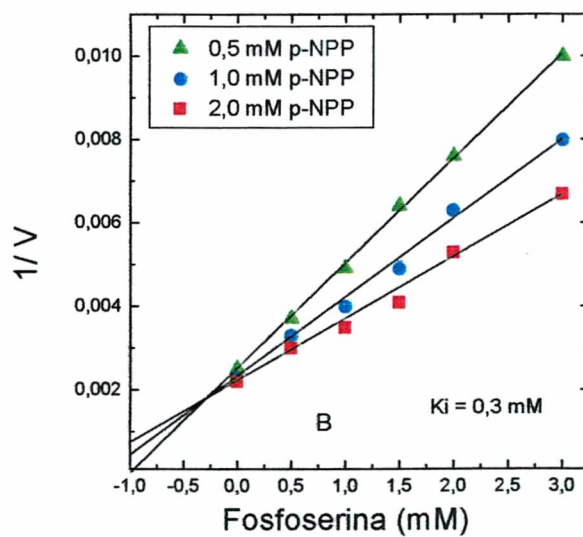
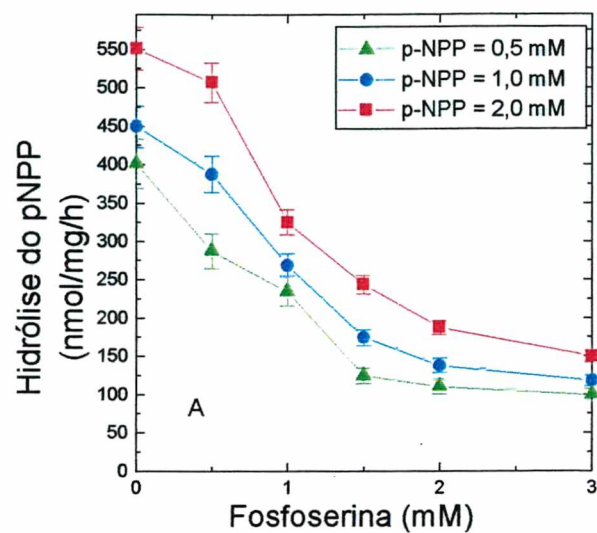


Figura 10- Efeito de Fosfoserina na velocidade de hidrólise de p-NPP. (A) a hidrólise de p-NPP foi realizada como descrito em Métodos, utilizando fosfoserina e p-NPP nas concentrações apresentadas na figura. (B) Plot de Dixon.

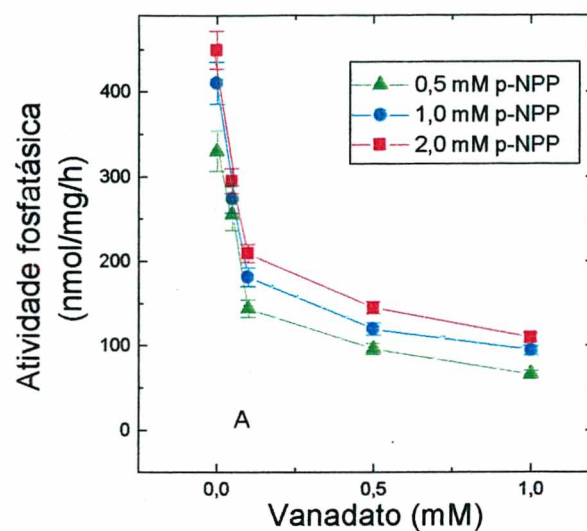


Figura 11- Efeito de vanadato na velocidade de hidrólise de p-NPP. A hidrólise de p-NPP foi realizada como descrito em Métodos, utilizando vanadato e p-NPP nas concentrações apresentadas na figura.

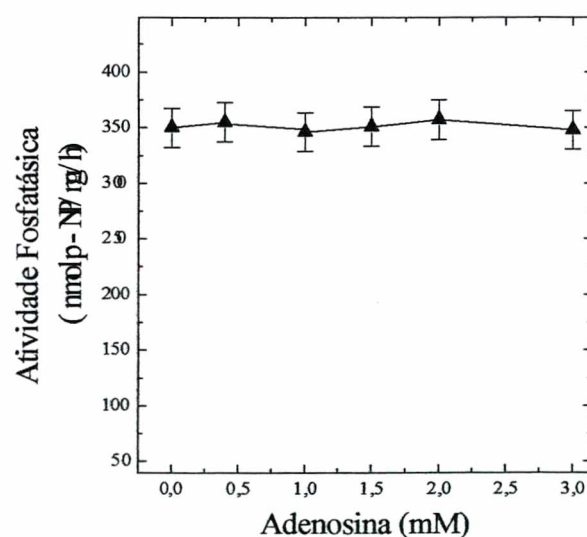


Figura 12- Efeito de Adenosina na velocidade de hidrólise de p-NPP. A hidrólise de p-NPP foi realizada como descrito em Materiais e Métodos, utilizando adenosina e p-NPP nas

Foi testada também a ação do vanadato na atividade fosfatásica da enzima, por ser um análogo do fosfato, conhecido como inibidor da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático. O vanadato inibiu a hidrólise do p-nitrofenilfosfato pela enzima ($K_{0,5} 0,1 \pm 0,06 \text{ mM}$) Figura 11.

Tabela 3- Constantes de inibição relacionadas ao efeito de diferentes compostos sobre a atividade fosfatásica da CF_0F_1 .

Compostos	Ki (mM)
AMP	$1,8 \pm 0,10$
ADP	$1,7 \pm 0,12$
Fosfoserina	$0,3 \pm 0,05$

4.4-UTILIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS OBTIDOS ATRAVÉS DO MÉTODO DE RECONSTITUIÇÃO DA CF_0F_1 , PARA O ESTUDO DO EFEITO DE EROs E ERNs SOBRE MEMBRANAS BILIPÍDICAS.

Os lipossomas foram preparados pelo método de diálise formando uma camada bilipídica, o mesmo utilizado para a reconstituição da CF_0F_1 (CRECZYNSKI-PASA & GRÄBER, 1994).

Os lipossomas foram preparados como descrito na metodologia na presença de azul de metileno; dessa forma, enquanto as vesículas lipídicas formavam-se, parte do corante adicionado ao meio de diálise ficava retido no interior dos lipossomas. Para comprovar este suposto resultado, após a preparação dos lipossomas foram adicionadas crescentes quantidades de detergente (Triton X-100). Com o passar do tempo (até uma hora), observou-se um fluxo de azul de metileno para fora das vesículas, detectado espectrofotometricamente a 668nm, (Figuras 13 e 14).

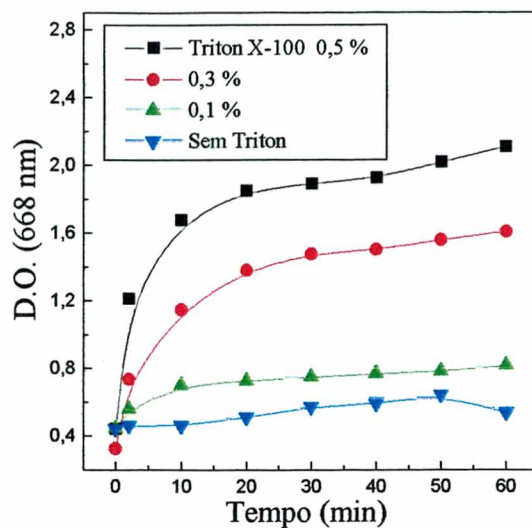


Figura 13- Efeito de Triton X-100 em lipossomas incorporados com azul de metileno. Os lipossomas foram preparados com asolecitina na presença de azul de metileno pelo método de diálise.

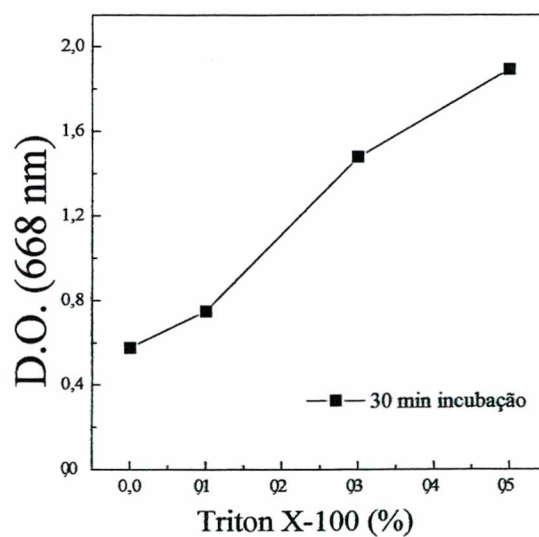


Figura 14- Efeito de [Triton X-100] em lipossomas incorporados com azul de metileno. de diálise, conforme descrito em Materiais e Métodos.

Os lipossomas preparados com azul de metileno, foram então testados em relação à permeabilidade da membrana ao corante frente à ação de EROs e ERNs. Foi verificado o efeito de óxido nítrico, através da incubação dos lipossomas, com nitroprussiato de sódio (doador de NO), do *tert*-butilhidroperóxido, do radical hidroxil e do peroxinitrito. Nenhuma destas espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio alteraram a permeabilidade da membrana bilipídica, nas condições testadas (Figura 15 e 16).

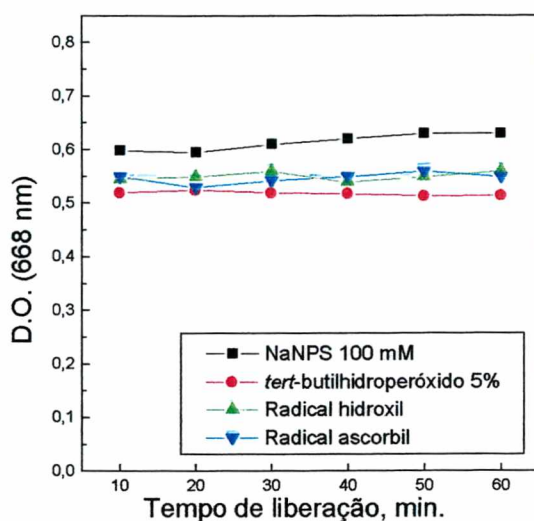


Figura 15- Efeito de NO, *tert*-butilhidroperóxido, radical hidroxil e ascorbil na permeabilidade dos lipossomas. Os lipossomas foram preparados como descrito em Materiais e Métodos, e incubados com os diferentes compostos indicados na figura.

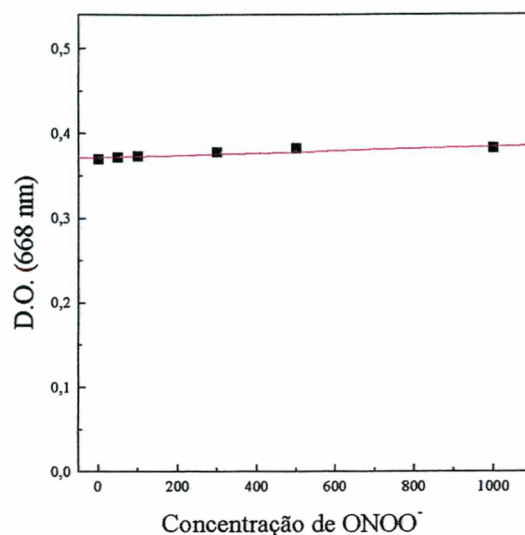


Figura 16- Efeito de peroxinitrito (ONOO^-) na permeabilidade dos lipossomas. Os lipossomas foram preparados e lavados, conforme descrito em Materiais e Métodos, e incubados com as diferentes concentrações de peroxinitrito conforme mostrado na figura.

4.5-EFEITO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DE NITROGÊNIO NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM LIPOSSOMAS.

Os lipossomas foram preparados conforme descrito na metodologia, na ausência de azul de metileno e submetidos aos tratamentos com diferentes EROs e ERNs. As espécies reativas utilizadas foram o radical hidroxila, gerado pelos sistemas (FeCl_3 + ascorbato e H_2O_2) o radical ascorbil, gerado na presença de (FeSO_4 + ascorbato), o radical monóxido de nitrogênio, liberado no meio pela incubação com nitroprussiato de sódio, e o peroxinitrito gerado pelo método “quenched flow synthesis”, conforme descrito em Materiais e Métodos (página 28)

O efeito do radical ascorbil em lipossomas e em microssomas de fígado de rato, está representado na Figura 17. Observa-se que os níveis de peroxidação lipídica em microssomas

são maior que em lipossomas, embora em ambos os casos os valores obtidos de TBARS, são significativamente diferentes dos respectivos controles.

O radical hidroxil, por sua vez, foi mais efetivo na peroxidação dos lipossomas, e, embora os valores TBARS obtidos com microssomas tenham sido significativamente maiores que o controle, a peroxidação foi bem menor nesta condição (Figura 18).

Somente na presença de monóxido de nitrogênio não foram detectados níveis significativos de peroxidação lipídica (Figura 19). Na Figura 20 estão representados os dados de peroxidação lipídica em lipossomas por peroxinitrito. Observa-se que, entre 0 e 50 μM de peroxinitrito, o efeito é bem pronunciado. Com o aumento da concentração desta espécie reativa até 300 μM a peroxidação não aumentou linearmente, sendo bem menos pronunciada, atingindo uma espécie de platô de saturação.

Para efeito de comparação dos efeitos de peroxidação das diferentes espécies reativas testadas em lipossomas, representou-se os dados conjuntamente na Figura 22.

Observa-se nesta figura que a peroxidação lipídica foi mais elevada na presença do radical ascorbil, seguido, na ordem decrescente, do peroxinitrito e do radical hidroxil, nas condições testadas. Como já foi mencionado, o monóxido de nitrogênio não apresentou efeito na peroxidação lipídica quando comparado ao grupo controle.

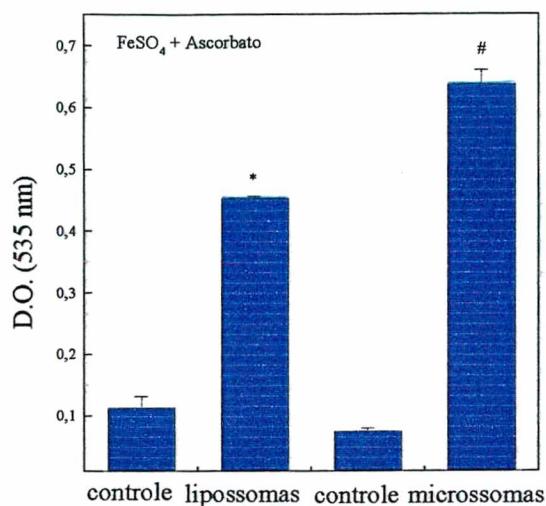


Figura 17- Peroxidação lipídica em lipossomas e microssomas de fígado de rato induzidas por radical ascorbil. Controle = grupos sem adição de FeSO₄/ascorbato sistema gerador do radical, no meio de reação. A peroxidação foi avaliada pelo método TBARS, conforme descrito em Materiais e Métodos. * relacionados ao controle dos lipossomas
relacionados ao controle dos microssomas

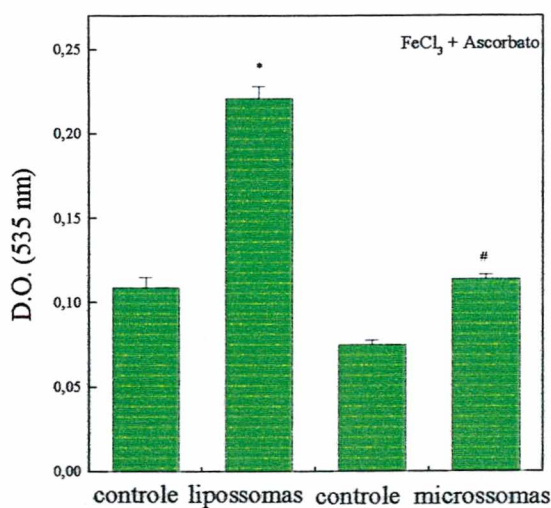


Figura 18- Peroxidação lipídica em lipossomas e microssomas de fígado de rato induzidas por radical hidroxil. Controle = grupos sem adição de FeCl₃/ascorbato e H₂O₂, sistema gerador do radical no meio de reação. A peroxidação foi avaliada pelo método TBARS, conforme descrito em Materiais e Métodos. * relacionados ao controle dos lipossomas
relacionados ao controle dos microssomas

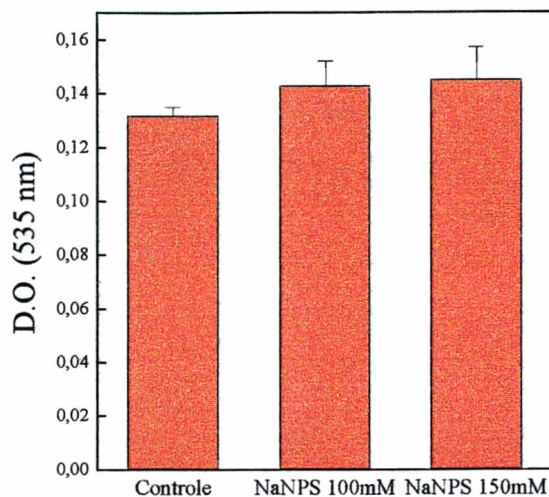


Figura 19- Efeito do nitroprussiato de sódio (NaNPS) na peroxidação lipídica em lipossomas. Controle = grupos sem a adição de NaNPS, sistema gerador do radical, no meio de reação. A peroxidação foi avaliada pelo método TBARS, conforme descrito em Materiais e Métodos.

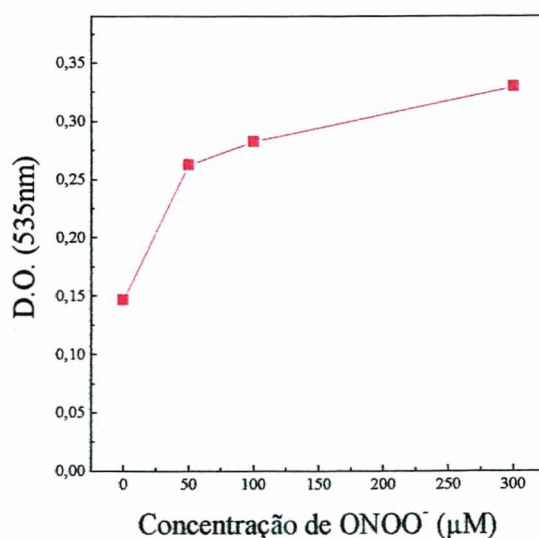


Figura 20- Efeito do peroxinitrito (ONOO⁻) na peroxidação lipídica em lipossomas. Controle = Os grupos sem a adição do peroxinitrito no meio de reação. A peroxidação foi avaliada pelo método de TBARS, conforme descrito em Materiais e Métodos.

A figura abaixo mostra o efeito na peroxidação lipídica em lipossomas, provocados pelo radical hidroxil (FeCl_3 + ascorbato e H_2O_2), ascorbil (FeSO_4 + ascorbato), do peroxinitrito e do monóxido de nitrogênio.

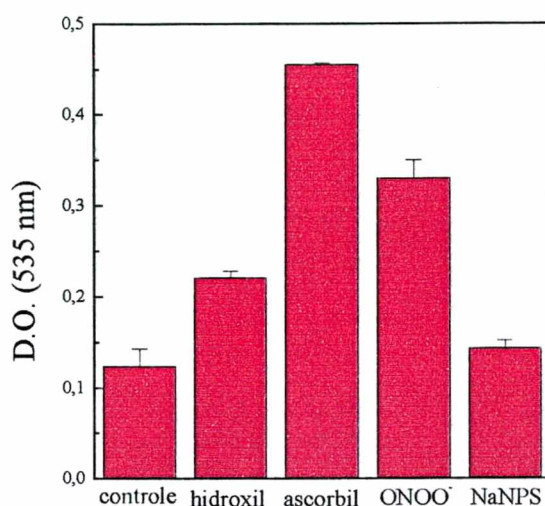


Figura 21- Efeito na peroxidação lipídica em lipossomas, provocados por radicais hidroxil ($\cdot\text{OH}$), ascorbil, peroxinitrito (ONOO^-) e monóxido de nitrogênio.

A concentração de peroxinitrito utilizada foi de 300 μM , o monóxido de nitrogênio foi gerado pela incubação com nitroprussiato de sódio (100 mM), os radicais hidroxil e ascorbil foram gerados pelos sistemas FeCl_3 +ascorbato+ H_2O_2 e FeSO_4 +ascorbato, respectivamente. A peroxidação foi avaliada pelo método de TBARS. O procedimento detalhado está descrito em Materiais e Métodos.

5- DISCUSSÃO

5.1- H^+ -ATPSINTETASE DE CLOROPLASTOS (CF_0F_1): INTERAÇÃO ENZIMA/SUBSTRATO

Nos experimentos de determinação do número de nucleotídeos livres e ligados na enzima, verificou-se que a preparação utilizada neste trabalho apresenta 2 ATP/ CF_0F_1 e 1 ADP/ CF_0F_1 ligados, resultados semelhantes aos encontrados por POSSMAYER *et al.*, (2000) em experimentos cromatográficos com a enzima isolada e purificada e que, segundo os mesmos autores, o ADP encontra-se ligado na subunidade β e as duas moléculas de ATP encontram-se ligados nas subunidades α .

Encontra-se um grande número de trabalhos, quando se revisa a literatura sobre as H^+ -ATPsintetases, discutindo a caracterização dos sítios para nucleotídeos (para revisão ver CRECZYNSKI-PASA *et al.*, 2000). No entanto, no que diz respeito ao grupamento fosfato neste sistema, poucos trabalhos são mencionados, destacando-se o trabalho de SHINORARA & SAKURAI (1980), onde mostraram que substâncias fosforiladas como β -naftiloligofosfatos inibem a fotofosforilação e a CF_0F_1 , competitivamente com ADP e ATP, respectivamente.

No caso da F_0F_1 de mitocôndria, POUGEOIS & LAUQUIN (1985) e GARIN *et al.*, (1989) detectaram um sítio de ligação de fosfato na subunidade β da enzima, que provavelmente, pode ser o sítio em que se liga o grupamento fosfato do substrato ATP.

A Figura 22³ mostra o mecanismo de ligação e troca proposto por BOYER (1975, 1989, 1993 e 1997). Este mecanismo elucida as mudanças conformacionais da enzima culminando com a liberação do ATP e, conseqüentemente, ligação de ADP e Pi na mesma, embora não estabeleça de fato, quem primeiramente se liga aos sítios catalíticos, ou seja ADP ou Pi, assim como o modelo descrito por GRÄBER (1994), onde novamente este passo, do ciclo da síntese de ATP, está indefinido, modelo representado na Figura 23.

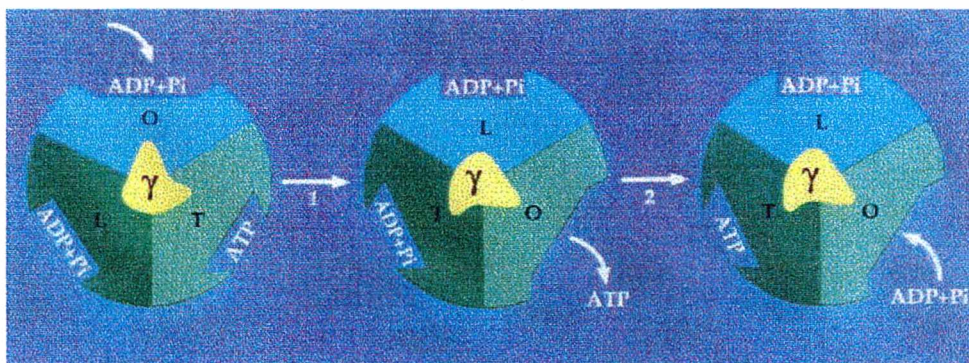


Figura 22- “The binding change mechanism” proposto por Boyer. O esquema acima mostra uma visão da porção superior da CF₀F₁ contendo os sítios catalíticos. A rotação na subunidade γ, provocada pelo fluxo de prótons provoca mudanças conformacionais nos três sítios catalíticos T, L e O, conformações “fechado”, “frouxo” e “aberto” respectivamente, ao qual resulta na mudança de afinidade aos substratos e produtos, cada sítio representa um par de subunidades α e β. Do sítio O é liberado o ATP (1) durante a catálise, e consecutivamente, liga-se a este sítio ADP e Pi que passa para a conformação L (ADP e Pi fracamente ligado) e, conseqüentemente, para a conformação T, momento em que o ATP é formado, passando então, para a conformação O de onde é liberado, e onde os substratos (ADP e Pi) ligam-se novamente de uma forma cíclica.

³ Modificado de DUNCAN *et al.* (1995)

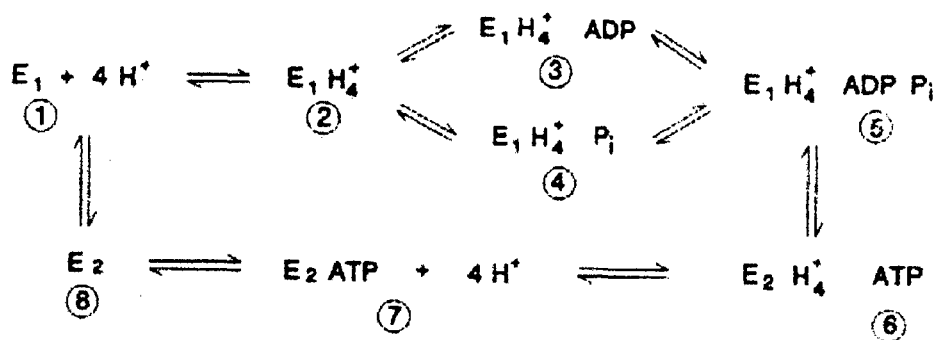


Figura 23- Ciclo catalítico da CF_0F_1 . Modelo proposto por GRÄBER (1994). Nos passos 1, 2, 3 e 4 os prótons estariam na parte interna da membrana e nos passos 6 e 7 na parte externa. Os passos definidos como 3 e 4 correspondem ao impasse colocado neste trabalho; isto é, ainda não foi demonstrado experimentalmente quem liga primeiro ao sítio entre ADP e P_i .

A H^+ -ATP sintetase (CF_0F_1), tem como função na natureza sintetizar ATP; entretanto, em condições experimentais especiais, a enzima pode hidrolisar ATP. Além de ATP, a CF_0F_1 pode hidrolisar pseudo-substratos como o p-NPP, atividade caracterizada por CRECZYNSKI-PASA *et al.*, (1997). Neste trabalho, foi mostrado que ATP e P_i inibem marcadamente a atividade fosfatásica da H^+ -ATP sintetase de cloroplastos (CF_0F_1). Estas observações, que podem estar relacionadas com o mecanismo de ação da enzima, nos levou a investigar a influência de outros compostos fosforilados e de nucleotídeos de adenina na atividade de síntese de ATP e na atividade fosfatásica da CF_0F_1 . Foram testados, então, os efeitos do AMP, fosfoserina, pirofosfato e adenosina na atividade de síntese de ATP. Observou-se que o AMP, a fosfoserina e o pirofosfato inibem esta atividade, apresentando constantes de inibição ($K_{0,5}$) muito semelhantes. A adenosina, composto não-fosforilado, não alterou a atividade da enzima.

Os efeitos dos compostos, AMP, ADP, fosfoserina, adenosina e vanadato foram também testados na atividade fosfatásica da enzima. Os resultados obtidos evidenciaram que todos inibem esta atividade, com exceção da adenosina. Entretanto, as constantes de inibição não foram semelhantes, como foi o caso das inibições na atividade de síntese de ATP. É

provável que os sítios da enzima envolvidos nestas duas atividades possam ser diferentes. Apresentamos abaixo um modelo representativo de como as diferentes substâncias fosforiladas testadas poderiam ligar-se aos sítios catalíticos da CF_0F_1 inibindo a atividade de síntese de ATP.

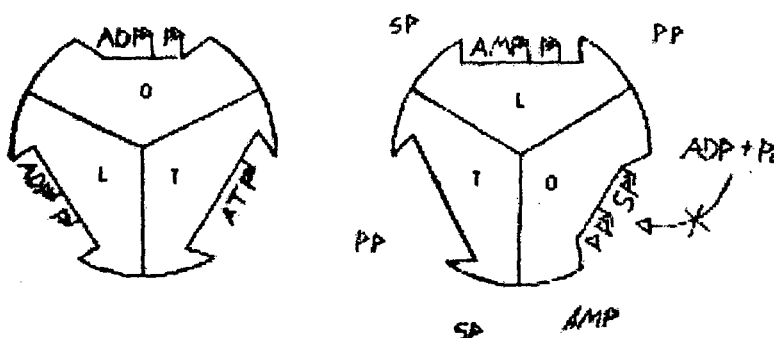


Figura 24- Ligação dos compostos fosforilados na enzima À direita temos os sítios ligados aos substratos da enzima, segundo o mecanismo proposto por Boyer. À esquerda propomos de que maneira os diferentes compostos fosforilados ligar-se-iam a enzima provocando a inibição da síntese de ATP. O AMP, pirofosfato (pp) e a fosfoserina (sp) ligar-se-iam aos sítios para ligação de nucleotídeos tendo sua afinidade determinada primeiramente, através de seus grupamentos fosfato competindo com os substratos da enzima na síntese (ADP e P_i), reforçando a idéia de que são estes grupamentos fosfato que direcionam a ligação dos substratos à enzima.

Baseados nos resultados que mostraram que estes compostos inibem a atividade fosfatásica da CF_0F_1 , bem como, os resultados obtidos em experimentos com a síntese de ATP, sugere-se que a presença de grupamentos fosfato nos compostos testados é responsável pela inibição de ambas atividades, uma vez que a adenosina, que corresponde a uma parte orgânica, não-fosforilada do nucleotídeo, não apresenta esta capacidade. Além disso, a inibição da atividade fosfatásica da CF_0F_1 pelo vanadato, com o menor $K_{0,5}$ comparando com os K_s dos outros compostos, reforça esta interpretação, pois o vanadato é um análogo do fosfato, considerando sua ação nas ATPases do tipo P. Estudos anteriores (CRECZYNSKI-PASA & GRÄBER (1994)) mostraram que, na presença de fosfato, a constante de velocidade para a ligação de ADP na enzima é fortemente aumentada quando a enzima é ativada pelo

potencial eletroquímico. Baseados nestas observações, e supondo que o sítio de ligação para Pi e para o grupamento fosfato do nucleotídeo seja o mesmo, sugerimos que o grupamento fosfato é o maior responsável pela especificidade da ligação de moléculas fosforiladas na enzima.

5.2-EFEITO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DE NITROGÊNIO EM LIPOSSOMAS

Com relação ao modelo desenvolvido com lipossomas para o estudo da ação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (EROs e ERNs), embora este tenha que ser melhor estudado, ficou evidenciado ser uma opção experimental viável para investigações que envolvem permeabilidade de membranas e peroxidação lipídica dentro deste contexto. Neste sentido, ficou caracterizado que o corante azul de metileno permanece dentro do interior dos lipossomas, pois foi observado o fluxo do corante somente na presença de detergente (Triton X-100).

Os lipossomas com azul de metileno incorporado, foram submetidos à ação de várias espécies reativas, uma vez que membranas biológicas são o alvo principal da ação destas moléculas (SAIJA *et al.*, 1994 e CASTELLI *et al.*, 1997). Para verificar os danos oxidativos provocados pela ação das diferentes espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio foram testados dois parâmetros: a permeabilidade dos lipossomas ao azul de metileno e a peroxidação lipídica provocada pela ação destas espécies reativas em lipossomas.

Os ensaios relacionados à ação do monóxido de nitrogênio, liberado pelo nitroprussiato de sódio sobre os lipossomas, não apresentaram efeito, tanto na permeabilidade, quanto na peroxidação lipídica. Segundo RUBBO *et al.* (1994), o NO^\bullet por si, não induz lipoperoxidação, resultados obtidos a partir de ensaios de peroxidação lipídica em lipossomas de fosfatidilcolina. O fato do NO^\bullet não causar danos oxidativos nestes sistemas, pode ser o

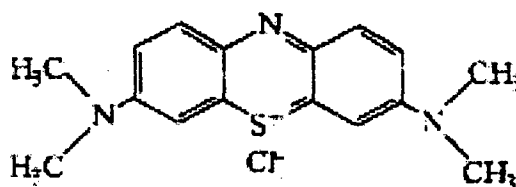
motivo pelo qual o mesmo não provocou também mudanças na permeabilidade dos lipossomas ao azul de metileno.

Nos ensaios em que danos oxidativos em lipossomas foram provocados pelo peroxinitrito (ONOO^-), também não foi verificada alteração na permeabilidade dos lipossomas ao corante, no entanto os testes de peroxidação lipídica mostraram o peroxinitrito como um poderoso oxidante, de sistemas biológicos, aspectos já demonstrados na literatura, (BECKMAN *et al.*, 1990; SARAN *et al.*, 1990).

As ações do radical hidroxil, gerado pelo sistema FeCl_3 + ascorbato e H_2O_2 e do radical ascorbil gerado pelo sistema FeSO_4 + ascorbato também não induziram alterações na permeabilidade dos lipossomas ao azul de metileno, mas apresentaram efeitos deletérios na peroxidação lipídica. Paralelamente a esses experimentos, foram realizados testes em microsomas de fígado de rato incubados nas mesmas condições que os lipossomas. Nos ensaios em que foi testado o radical hidroxil, foi observada uma maior peroxidação lipídica nos lipossomas, quando comparados aos microsomas. Já nos ensaios com o radical ascorbil, os resultados mostraram maior peroxidação lipídica nos microsomas de rato, quando comparados aos lipossomas. Essas diferenças podem ser explicadas pela possível presença de defesas antioxidantes presentes nos microsomas, porém em ambos os casos a peroxidação lipídica foram significativamente maiores quando comparadas com os grupos controle.

O uso de lipossomas unilamelares em estudos de peroxidação lipídica é amplamente documentado na literatura (BARKLAY & VINQVIST, 1994; FRIMER *et al.*, 1996), sendo considerados modelos estruturais de membranas biológicas aceitáveis como alvos para oxidação. Em adição, segundo CASTELLI *et al.* (1997), lipossomas unilamelares são mais susceptíveis à ação de radicais gerados do lado externo das suas membranas do que lipossomas multilamelares, e isso, excluem problemas no que se refere ao acesso dos mesmos a todas as camadas lipídicas dos lipossomas multilamelares.

Segundo TIROSH *et al.*, (1997) a constituição lipídica e a organização dos lipídios na estrutura das membranas podem também, pelo menos em parte, proteger as mesmas contra danos oxidativos. Em nosso modelo, usamos no processo de reconstituição a asolecitina, uma mistura de fosfolipídios indefinida e que, ao final do processo, forma lipossomas, menos permeáveis, já que os mesmos lipossomas, quando reconstituídos com a CF_0F_1 , apresentam um menor fluxo passivo de prótons pela membrana, e, por essa razão, são mais resistentes a peroxidação de modo que a permeabilidade não seja alterada, podendo ter dificultado o fluxo do azul de metileno do interior das vesículas. Lipossomas com outras constituições lipídicas, também serão testados no futuro.



Fórmula estrutural do Azul de metileno

Além disso, os lipossomas obtidos através do processo de reconstituição da CF_0F_1 são um modelo bilaminar, semelhante à matriz lipídica das células, e, provavelmente, os danos oxidativos podem estar ocorrendo na camada lipídica mais externa dos lipossomas.

Esses resultados sugerem que não há uma relação direta entre os danos oxidativos em lipídeos (lipoperoxidação) com a permeabilidade dos lipossomas, neste modelo, ou que esses danos quando ocorrem, não são suficientes para provocar mudanças na permeabilidade dos lipossomas, pelo menos a macromoléculas como o azul de metileno.

6- CONCLUSÕES

6.1-ESTUDO DO EFEITO DE COMPOSTOS FOSFORILADOS (NÃO-SUBSTRATOS) NA ATIVIDADE DE SÍNTESE DE ATP E NA ATIVIDADE FOSFATÁSICA DA CF_0F_1

Os resultados obtidos nos estudos da ação de compostos fosforilados e/ou não-fosforilados na atividade de síntese de ATP e na atividade fosfatásica da CF_0F_1 nos permitiu chegar às seguintes conclusões:

- i) Verificou-se que a preparação da enzima solúvel apresenta 2 ATP/mol CF_0F_1 e 1 ADP/mol CF_0F_1 ligados;
- ii) Os compostos AMP, fosfoserina e pirofosfato inibem a atividade de síntese de ATP, apresentando constantes de inibição (K_i) muito semelhantes, enquanto a adenosina não alterou a atividade da enzima;
- iii) Os resultados obtidos evidenciaram que todos os compostos, isto é, AMP, ADP, fosfoserina e vanadato, inibem também a atividade fosfatásica, com exceção da adenosina, parte orgânica dos nucleotídeos de adenina. Entretanto, as constantes de inibição não foram semelhantes, como foi o caso das inibições na atividade de síntese de ATP, sendo provável que os sítios da enzima envolvidos nestas duas atividades sejam diferentes.
- iv) Baseados nos resultados que mostraram que estes compostos inibem a atividade fosfatásica da CF_0F_1 e a atividade de síntese de ATP, sugere-se que a presença de grupos fosfato nos compostos testados é responsável pela inibição de ambas atividades.

vi) A ligação de ADP na enzima é fortemente aumentada quando a enzima é ativada pelo potencial eletroquímico. Supondo que o sítio de ligação para Pi e para o grupamento fosfato do nucleotídeo seja o mesmo, sugerindo que o grupamento fosfato é o maior responsável pela especificidade da ligação de moléculas fosforiladas na enzima.

vii) Reforçando esta teoria, estão os resultados do uso de adenosina, que corresponde a uma parte não-fosforilada dos nucleotídeos de adenina, que não apresentou inibição em ambas as atividades, além da ação do vanadato, um análogo do grupamento fosfato, inibindo acentuadamente a atividade fosfatásica da CF_0F_1 .

6.2-USO DOS LIPOSSOMAS OBTIDOS ATRAVÉS DA RECONSTITUIÇÃO DA CF_0F_1 COMO MODELO DE ESTUDO DE EROS E ERNs.

O estudo envolvendo a nova técnica com lipossomas, obtidos através da reconstituição da CF_0F_1 , como modelo de estudo de EROS E ERNs, nos permite concluir:

- i) Os resultados obtidos com os lipossomas reconstituídos mostraram que o modelo é viável para o estudo proposto;
- ii) O monóxido de nitrogênio, liberado por nitroprussiato de sódio, não provocou alteração na permeabilidade das membranas, e tampouco na peroxidação lipídica;
- iii) A ação dos radicais hidroxil e ascorbil, e do peroxinitrito, também não provocou alteração na permeabilidade dos lipossomas ao azul de metileno; todavia, todos apresentaram efeito sobre a peroxidação lipídica;
- iv) Esses resultados sugerem que não há uma relação direta entre os danos oxidativos (lipoperoxidação) com a permeabilidade dos lipossomas, ou que esses danos, quando ocorrem, não são suficientes para provocar mudanças na permeabilidade dos lipossomas, pelo menos a macromoléculas como o azul de metileno e nas condições testadas.

7- PERSPECTIVAS

Este trabalho abriu algumas perspectivas futuras no que se refere ao estudo com lipossomas. Pretende-se investigar a ação de EROs e ERNs sobre a permeabilidade das membranas bilipídicas a íons como H^+ e Ca^{2+} , utilizando-se sondas fluorescentes. Além disso, pretende-se caracterizar este modelo de lipossomas bilaminares para estudos de substâncias lipossolúveis e hidrossolúveis de origem natural ou sintética, com potencial de ação antioxidante.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARKLAY, L.R.C.; VINQVIST, M.R. Membrane peroxidation: inhibiting effects of water-soluble antioxidants on phospholipids of different charge types. **Free Rad. Biol. Med.**, v.16, p.779-788, 1994.
2. BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN J. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.87, p.1620-1624, 1990.
3. BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Meth. Enzymol.**, v.90, p.105-110, 1984.
4. BÖTTCHER, B.; SCHWARZ, L.; GRÄBER, P. Direct indication for the existence of a double stalk in CF₀F₁. **J. Mol. Biol.**, v.281, p.757-762, 1998.
5. BOYER, P. D. A conformational coupling of membrane potential and proton translocation to ATP synthesis and to active transport. **FEBS Lett.**, v. 58, p.1-6, 1975.
6. BOYER, P. D. A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis. **FASEB J.**, v.3, p.2164-2178, 1989.
7. BOYER, P. D. The ATP synthase: a splendid molecular machine. **Annu. Rev. Biochem.**, v.66, p. 717-749, 1997.
8. BOYER, P. D. The binding Change mechanism for ATP synthase – some probabilities and possibilities. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1140, p. 215-250, 1993.
9. BRUIST, M.F.E.; HAMMES, G. G. Mechanism for catalysis and regulation of adenosine 5'-triphosphate hydrolysis by chloroplasts coupling factor 1. **Biochem.**, v.21, p.3370-3377, 1982.
10. CARMELI, C.; AVRON, M. A light-triggered adenosine triphosphate-phosphate exchange reaction in chloroplasts. **Eur. J. Biochem.**, v.2, p.318-326, 1967.
11. CARMELI, C.; LIFSSHITZ, Y. Effects of Pi and ADP on ATPase activity in chloroplasts. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.267, p.86-95, 1972.

12. CASALINO, E.; SBLANO, C.; LANDRISCINA. A possible mechanism for Inibition of lipid peroxidation by ascorbate in rat liver microssomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.28, p.137-149, 1996.
13. CASTELLI, F.; TROMBETTA, D.; TOMAINO, A.; BONINA, F.; ROMEO, G.; UCCELLA, N.; SAIJA, A. Dipalmitoylphosphatidylcholine/linoleic acid mixed unilamellar vesicles as model membranes for studies on novel free-radical scavengers. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, V.37, p.135-141, 1997.
14. COOPER, G. M. **The Cell: A molecular approach**. 2ed. Washington, D.C: ASM Press, 2000.
15. CRECZYNSKI-PASA, T. B.; GRÄBER, P. ADP binding and ATP synthesis by reconstituted H⁺-ATPase from chloroplasts. *FEBS Lett.*, v.350, p.195-198, 1994.
16. CRECZYNSKI-PASA, T. B.; GRÄBER, P. Phosphatase activity of H⁺-ATPase from chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1320, p.58-64, 1997.
17. CRECZYNSKI-PASA, T.B.; POSSMAYER, F.E.; SCOFANO, H.M.; GRÄBER, P. Characterization of nucleotide binding sites of the isolated H⁺-ATPase from spinach chloroplasts, CF₀F₁ *Arch. Biochem. and Biophys.*, v.376, p.141-148, 2000.
18. DIMROTH, P.; MATTHEY, U.; KAIM, G. Critical evaluation of the one-versus the two-channel model for the operation of the ATP synthase's F₀ motor. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1459, p.506-513, 2000.
19. DUNCAN, T.M.; BULYGIN, V.V.; ZHOU, Y.; HUTCHEON, M.L.; CROSS, R.L. Rotation of subunits during catalysis by *Escherichia coli* F₁-ATPase. *Biochem.*, v.92, p.10964-10968, 1995.
20. DUNHAM, K. R.; SELMAN, B.R. Interactions of inorganic phosphate with spinach coupling factor 1: effects on ATPase and ADP binding activities. *J. Biol. Chem.*, v.256, p.10044-10049, 1981.
21. DUNN, S.D.; BI, I.; REVINGTON, M. A re-examination of the structural and functional consequences of mutation of alanine-128 of the *b* subunit of *Escherichia coli* ATP synthase to aspartic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1459, p.521-527, 2000.
22. ELSTON, T.; WANG, H.; OSTER, G. Energy transduction in ATP synthase. *Nature*, v.391, p.510-513, 1998.
23. ENGELBRECHT, S.; JUNGE, W. Purified subunit delta of chloroplast coupling factor CF₁ reconstitutes photophosphorylation in partially CF₁ depleted membranes. *Eur. Biochem.*, v.172, p.213-218, 1988.
24. FELDMAN, R. I.; SIGMAN, D. S. The synthesis of ATP by the membrane-bound ATP synthase complex from medium 32 Pi under completely uncoupled conditions. *J. Biol. Chem.*, v.258, p.12178-83, 1983.
25. FELDMAN, R. I.; SIGMAN, D. S. The synthesis of enzyme-bound ATP by soluble chloroplast coupling factor 1. *J. Biol. Chem.*, v.257, p.1676-1683, 1982.

26. FRIMER, A.A.; STRUL, G.; BUCH, J.; GOTTLIEB, H.E. Can superoxide organic chemistry be observed within the liposomal bilayer?. **Free Rad. Biol. Med.**, v.20, p.843-852, 1996.
27. GARIN, J.; MICHEL, L.; DUPUIS, A. Photolabeling of the phosphate binding site of mitochondrial F₁-ATPase by [P₃₂] azidonitrophenyl phosphate identification of the photolabeled amino acid residues. **Biochem.**, v.28, p. 1442-1448, 1989.
28. GRÄBER, P. The H⁺-ATPase from chloroplasts: energetics of the catalytic cycle. **Biochem. Biophys. Acta**, v.1187, p.171-176, 1994
29. GRÄBER, P.; BÖTTCHER, B.; BOEKEMA, E. FROMME, P.; BOEKEMA, E. J.; GRÄBER, P. Isolation and characterization of a supramolecular complex of subunit III of the ATP-synthase from chloroplasts. **Z. Naturforsch.**, v.42c, p.1239-1245, 1987.
30. GRÄBER, P.; BÖTTCHER, B.; BOEKEMA, E. J. Kinetics of proton-transport coupled ATP synthesis in chloroplasts. In: Milazzo, G. and Blank, M.; eds. **Bioelectrochem. III.**, New York: Plenum Press, p.279, 1990.
31. GRÄBER, P.; SCHLODDER, E.; WITT, H. T. Conformational change of the chloroplast ATPase induced by a transmembrane electric field and its correlation to phosphorylation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 461, p. 426-440, 1977.
32. GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v.126, p. 131-138, 1982.
33. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Formation of thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals. **FEBS Lett.**, v.128, p.347-52, 1981.
34. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 3ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.
35. JONES, D. P. Renal metabolism during normoxia, hypoxia, and ischemic injury. **Ann. Ver. Physiol.**, v.48, p.33-50, 1986.
36. KLEINVELD, H. A.; SWAAGA, J. G.; HACK, C. E. Interactions between oxygen free radicals and proteins. Implications for rheumatoid arthritis. **Scandinavian J. Rheumatol.**, v.18, p.341-352, 1989.
37. KOPPENOL, W.H.; KISSNER, R.; BECKMAN, J.S. Syntheses of peroxynitrite: To go with flow or on solid grounds?. **Meth. Enzymol.**, v.269, p.296-302, 1996.
38. LUNARDI, J.; GERIN, J.; ISSARTEL, J. P.; VIGNAIS, P. V. Mapping of nucleotide-depleted mitochondrial F₁ ATPase with 2-azido-[alpha 32 P] adenosine diphosphate. Evidence for two nucleotide binding sites in the beta subunit. **J. Biol. Chem.**, v.262, p. 15172-15181, 1987.
39. MAGNUSSON, R. P.; MCCARTY, R. E. Light-induced exchanged of nucleotides into coupling factor 1 in spinach chloroplasts thylakoids. **J. Biol. Chem.**, v.251, p.7417-7422, 1976.

40. MCCARTY, R. E.; RACKER, E. Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation III. Activacion of adenosine triphosphatase and ^{32}P -labeled orthophosphate-adenosine triphosphate exchange in chloroplasts. **J. Biol. Chem.**, v.243, p.129-37, 1968.
41. MIGNACO, J. A.; LUPI, O. H.; SANTOS, F. T.; BARRABIN, H.; SCOFANO, H. M. Two simultaneous binding sites for nucleotide analogs are kinetically distinguishable on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. **Biochem.**, v.35, p.3886-3891, 1996.
42. MITCHELL, P. A chemiosmotic molecular mechanism for proton translocating adenosine triphosphatases. **FEBS Lett.**, v.43, p.189-194, 1974.
43. NALIN, C. M.; MCCARTY, R. E. Role of a disulfide bond in the γ subunit in activacion of the ATPase of chloroplast coupling factor 1. **J. Biol. Chem.**, v.259, p.7275-7280, 1984.
44. NELSON, N.; NELSON, H.; RACKER, E. Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylacion. XI. Magnesium adenosine triphosphatase properties of heat-activated coupling factor 1 from chloroplasts. **J. Biol. Chem.**, v.247, p.6506-6510, 1972.
45. PEDERSEN, P. L.; CARAFOLI, E. Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. **Trends. Biochem. Sci.**, v.12, p.146-150, 1987a.
46. PEDERSEN, P. L.; CARAFOLI, E. Ion motive ATPases. II. Energy coupling and work output. **Trends. Biochem. Sci.**, v.12, p.186-189, 1987b.
47. PICK, U.; RACKER, E. Purification and reconstitution of the $\text{N}_5\text{N}'$ -dicyclohexylcarbodiimide-sensitive ATPase complex from spinach chloroplasts. **J. Biol. Chem.**, v.254, p.2793-2799, 1979.
48. POSSMAYER, F.E.; HARTOG, F.A.; BERDEN, J.A.; GRÄBER, P. Covalente modification of the catalytic sites of the H^+ -ATPase from chloroplasts whit 2-nitreno-ADP. Modification of catalitic site (tight) and catalytic sites 1 and 2 together impairs both uni-site and multi-site catalysis of ATP syntesis and ATP hydrolisis. **Biochim. Biophys. Acta**, V.1459, p.202-217, 2000.
49. POU GEOIS, R.; LAUQUIN, G. J. M. Further investigations on the inorganic phosphate binding-site of beef-heart mitochondrial F_1 -ATPase. **Biochem.** v.24, p. 1020-1024, 1985.
50. RUBBO, H.; RADI, R.; TRUJILLO, M.; TELLERI, R.; KALYANARAMAN, B.; BARNES, S.; KIRK, M.; FREEMAN, B.A. Nitric oxid regulation of superoxide and peroxinitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen -containing oxidized lipid derivates. **J. Biol. Chem.** v.269, p.26066-26075, 1997.
51. SABBERT, D.; ENGELBRECHT, S.; JUNGE, W., Intersubunit rotation in active F_1 -ATPase. **Nature**, v.381, p.623-626. 1996.
52. SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D. Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. **Free Rad. Biol. Med.**, v.19, p.481-486, 1995.

53. SARAN, M.; MICHEL, C.; BORS, W. Reaction of NO with $O_2^{\bullet-}$: implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). **Free Rad. Res. Commun.**, v.10, p.221-226, 1990.
54. SCHENKMAN, J.B.; CINTI, D.L. Preparation of microsomes with calcium. **Meth. Enzymol.**, v.52, p.83-89, 1978.
55. SCHMIDT, G.; GRÄBER, P. The rate of ATP synthesis by reconstituted CF_0F_1 liposomes. **Biochim. Biophys. Acta**, v.808, p.46-54, 1985.
56. SHINOHARA, K.; SAKURAI, H. β -naphthyl oligophosphates: Inhibitors of photophosphorylation and H^+ -ATPase of spinach chloroplasts. **Plant & Cell Physiol.** v.21, p.75-84, 1980.
57. SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.**, v.215, p.213-219, 1993.
58. SONE, N.; YOSHIDA, M.; HIRATA, H.; KAGAWA, Y. Reconstitution of vesicles capable of energy transformation from phospholipids and adenosine triphosphatase of thermophilic bacterium. **J. Biochem.**, v.81, p.519-528, 1977.
59. TIROSH, O.; KOHEN, R.; KATZHENDLER, J.; ALON, A.; BARENHOLZ, Y. Oxidative stress effect on the integrity of lipid bilayers is modulated by cholesterol level of bilayers. **Chem. Phys. Lipids**, v.87, p.17-22, 1997.
60. van WALRAVEN, H.S.; BAKELS, R.H.A. Function, structure and regulation of cyanobacterial and chloroplast ATP synthase. **Physiol. Plant.** v.96, p.526-532, 1996.
61. WADA, Y.; SAMBONGI, I.; FUTAI, M. Biological nano motor, ATP synthase F_0F_1 : from catalysis to γ and c_{10-12} subunit assembly rotation. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1459, p.499-505, 2000.
62. WISE, J. G.; HICKE, B. J.; BOYER, P. D. Catalytic and non-catalytic nucleotide binding sites of the *Escherichia coli* F_1 -ATPase. **FEBS Lett.**, v.223, p.391-394, 1987.
63. XIA, Y.; ZWEIER, J. L. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. **Med. Sci.**, v.94, p.6954-6958, 1997.
64. YIN, J.J.; SMITH, M. J.; EPPLEY, R.M.; PAGE, S.W.; SPHON, J.A. Effects of fumonisin B₁ on lipid peroxidation in membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1371, p.134-142, 1998.